

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

PAR LE Dr GIUSEPPE SANARELLI

Docent d'Hygiène (Rome)

(Travail du Laboratoire de M. E. Metchnikoff à l'Institut Pasteur.)

3^e MÉMOIRE

I

L'ACCOUTUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE
DANS LA FIÈVRE TYPHOÏDE HUMAINE

Les étroites analogies que j'ai signalées entre la fièvre typhoïde humaine et celle des laboratoires ont mis en évidence les notes prédominantes, communes à ces deux formes morbides, savoir : les lésions toxiques de l'appareil digestif⁴.

Toutefois, dans aucune de ces fièvres, ce processus intestinal ne représente le point de départ, ni une localisation du virus typhique. Il doit être considéré seulement comme une complication aggravante, qui peut même devenir le fait prédominant de la maladie, lorsque celle-ci est de longue durée, comme chez l'homme.

Nous avons vu, en effet, que l'entérite aiguë qui, chez les animaux, se termine par la desquamation de l'épithélium intestinal, par l'infiltration des follicules lymphatiques, par l'extraordinaire multiplication des microbes intestinaux, et qui, chez l'homme, à cause de la durée plus longue de la période fébrile

4. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, n^o 11, 1892, et n^o 4, 1894.

et, par conséquent, de l'intoxication, peut finir par l'ulcération (nécrose toxique) des plaques de Peyer, n'est que la conséquence d'une action élective, spécifique, de la toxine typhique, sur la muqueuse de l'appareil digestif.

La présence des bacilles d'Eberth n'a donc rien de commun avec les phénomènes si complexes et si caractéristiques qui se développent le long du tube intestinal. Ces bacilles peuvent agir de loin et en vertu de leur poison, qu'ils se trouvent localisés de préférence dans les séreuses, comme chez les animaux, ou dans la rate, comme chez l'homme.

C'est pourquoi nous devons considérer la fièvre typhoïde comme une infection du système lymphatique, à la toxine de laquelle les muqueuses en général, et les muqueuses intestinales en particulier, réagissent de la même manière que le tégument cutané dans le cours de quelques maladies exanthématiques, comme la variole, la rougeole et la scarlatine.

Il arrive même que dans ces maladies, comme aussi dans l'érysipèle, la pyohémie, etc., on rencontre souvent quelques lésions intestinales dont l'analogie avec les lésions de la fièvre typhoïde est telle que l'on a pu croire autrefois à la connexité de ces diverses affections¹.

D'autre part on sait que, dans la fièvre typhoïde humaine, il n'y a aucun rapport entre l'extension des lésions intestinales et la gravité des symptômes cérébraux ou abdominaux, tels que l'intensité de la diarrhée.

Enfin, la diarrhée et les lésions intestinales ne font pas invariablement partie du tableau clinique et anatomo-pathologique de la fièvre typhoïde ; sur 100 cas observés par Murchison, on en trouva 7 dans lesquels les symptômes intestinaux n'apparurent à aucune période, et 4 qui, malgré la constipation préexistante, eurent des suites mortelles.

Ces considérations nous ramènent de quelques pas en arrière dans l'histoire étiologique si controversée de la fièvre typhoïde, et nous expliquent, en grande partie, qu'une symptomatologie si protéiforme ait pu rendre possible, pendant longtemps, la création d'un nombre infini de dénominations et d'entités nosologiques distinctes.

1. Voir C. MURCHISON, *La fièvre typhoïde* (Trad. par Guéneau de Mussy), Paris, 1878, p. 248.

La découverte du bacille d'Eberth a eu le grand mérite de grouper et d'identifier toutes ces formes morbides ; mais, d'autre part, elle a eu le désavantage de fausser un peu l'exacte interprétation de ce processus à la fois toxique et infectieux, entrevue depuis longtemps par *Petit et Serres*¹, et ensuite spécialement mise en lumière par *Trousseau*.

Désormais la fièvre typhoïde ne peut pas plus être considérée comme une maladie de l'intestin, que la variole comme une maladie de la peau. L'exanthème intestinal de l'une et l'exanthème cutané de l'autre ne représentent ni le siège du virus, ni ce qu'on appelle l'*essence* de la maladie ; lorsqu'ils se manifestent avec une gravité insolite, ils en constituent seulement la complication la plus redoutable.

Mais de ce que, au point de vue clinique, ces complications peuvent être insignifiantes ou nulles, il faut conclure que, dans la fièvre typhoïde humaine, la réaction intestinale au poison typhique, qui se montre indépendante de la gravité plus ou moins grande du processus infectieux, peut être liée à des conditions tout à fait particulières de la muqueuse intestinale.

Ces conditions anatomiques ou fonctionnelles de la tolérance vis-à-vis d'un poison si actif, dans d'autres cas, sur toutes les muqueuses, méritent d'être étudiées et, s'il est possible, expérimentalement reproduites.

Nous trouvons quelques observations, de nature à nous diriger dans cette nouvelle voie, chez les auteurs qui ont traité, avec compétence, de la *rechute* qui se produit quelques jours après la convalescence d'une fièvre typhoïde, et peut finir par la mort.

Dans ce cas on trouve, à l'autopsie, non seulement que les seules glandes intestinales frappées sont précisément celles qui ont échappé à la première attaque, mais que les lésions mêmes de la rechute sont moins étendues que celles du processus précédent². *Trousseau* va même jusqu'à nier que, dans les rechutes, les lésions caractéristiques de l'intestin puissent se renouveler³.

1. *Traité de la fièvre entéro-mésentérique*, Paris, 1813. (... Les lésions morbides de l'intestin résultent de l'introduction d'un poison dans l'économie et sont d'une nature éruptive comme les pustules de la variole..., p. 459, 465 et introd., p. 20, 39.)

2. MURCHISON, *Ibid.*, p. 463.

3. TROUSSEAU, *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu*, 1861, p. 458. (... Quoique l'appareil symptomatique soit très complet, quoique l'éruption cutanée se reproduise, la lésion caractéristique de l'intestin ne se renouvelle pas....)

Ces faits démontrent d'une manière assez évidente que la muqueuse intestinale, après avoir subi une première fois l'action du poison typhique, peut tolérer impunément une seconde attaque, même mortelle, de la maladie, et manifester, comme acquise, cette espèce d'immunité pour le poison typhique, que, dans une première attaque, on est parfois contraint de considérer comme naturelle (fièvre typhoïde sans lésions intestinales).

Si l'on considère ensuite que, dans les *rechutes*, malgré l'absence ou la bénignité des lésions intestinales, la maladie générale peut se développer de la manière la plus grave, parce que l'immunité vaccinale n'a pas encore eu le temps nécessaire pour s'établir, on aura encore un nouvel argument en faveur de la nature exclusivement toxique des altérations intestinales dans la fièvre typhoïde.

Étudions maintenant la nature de cette tolérance acquise par les parois intestinales pour la toxine typhique.

Puisqu'on peut exclure, même *a priori*, la possibilité d'une vaccination locale, soit parce que la muqueuse intestinale n'offre, d'ordinaire, aucune localisation du virus, soit parce qu'une vaccination locale ne s'expliquerait pas avec l'état de réceptivité générale à la nouvelle infection, il ne reste d'admissible que l'hypothèse suivant laquelle il s'agirait d'une *accoutumance* spéciale de l'intestin aux produits toxiques du bacille d'Eberth.

Cette *accoutumance* d'une catégorie déterminée d'éléments cellulaires aux poisons microbiens a déjà été signalée d'une manière générale, à plusieurs reprises, par Metchnikoff, et confirmée par des recherches ultérieures de De Bary¹ et de Metchnikoff et Roudenko².

Pour ce qui concerne la toxine du bacille typhique, déjà dès 1887 Beumer³ démontra que l'injection répétée de cultures stérilisées du bacille d'Eberth rend les rats réfractaires aux doses mortelles de cette toxine.

Dans mes premières recherches sur la vaccination contre la fièvre typhoïde expérimentale⁴, j'ai également démontré que les cobayes guéris spontanément, mais non encore devenus

1. Vorlesungen über Bakterien, 1883, p. 109.

2. Recherches sur l'accoutumance aux produits microbiens (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 567).

3. Der derzeitige Standpunkt der Schutzimpfungen, 1887, p. 4.

4. *Loc. cit.*, p. 745, 1892.

réfractaires au virus typhique, pouvaient supporter impunément des doses de liquide vaccinal qui, chez d'autres cobayes, étaient capables de produire un amaigrissement excessif et même la mort.

Puisque, comme nous le verrons plus tard, ces phénomènes ne peuvent être attribués à aucune propriété antitoxique de l'organisme normal ou vacciné, on doit, nécessairement, les considérer comme étant dus à l'accoutumance des cellules.

Mais, dans ces derniers cas, il s'agit évidemment d'un phénomène général, en vertu duquel les cellules de l'organisme, surtout les leucocytes, deviennent insensibles à l'influence des poisons, d'où il résulte que, au lieu d'en être repoussés, ils se dirigent vers eux, englobent les microbes, les empêchent de produire de nouveau poison et enfin les tuent.

Dans l'immunité naturelle ou acquise de l'intestin dans la fièvre typhoïde humaine, on constate, au contraire, le cas très singulier d'une *accoutumance* locale qui, jusqu'à présent, n'a été signalée ni étudiée par personne.

Ici, le poison typhique se produit et exerce son action toxique générale en agissant sur les centres nerveux, déterminant la réaction fébrile typique de la maladie, occasionnant même la mort, mais respectant précisément les organes et les cellules qui, par l'importance de leurs réactions, représentent souvent le symptôme le plus grave de la fièvre typhoïde chez l'homme.

II

L'ACCOUTUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE DANS LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

Une circonstance très remarquable, qui fait espérer qu'on pourra supprimer, chez les animaux, la violente réaction intestinale de la fièvre typhoïde expérimentale, se présente chaque fois qu'on fait l'autopsie d'un cobaye mort pendant ou peu après la vaccination.

Quelquefois ces animaux, très sensibles à la toxine typhique, meurent après les premières injections du liquide vaccinal; d'autres fois, au contraire, c'est après la période de la vaccination, par l'effet d'un véritable empoisonnement chronique.

Dans ce dernier cas, l'intestin de ces animaux apparaît tout à fait normal. Cela fait supposer que les parois de ce canal, après avoir subi graduellement l'influence du poison typhique pendant la vaccination, ont acquis le degré d'accoutumance nécessaire pour une immunité locale, sans modifier en rien la réceptivité générale.

Ces résultats font un singulier contraste avec ceux que l'on observe lorsque les animaux succombent par l'effet d'une vaccination trop précipitée, par des doses ou trop élevées, ou trop rapprochées l'une de l'autre.

Dans ces cas, l'intestin présente toujours les signes manifestes d'un processus réactionnel plus ou moins accentué ; l'émigration des microbes intestinaux, que j'ai eu l'occasion de mentionner dans mon précédent mémoire, reste même favorisée.

Comme l'intestin des cobayes réagit mieux que celui de tous les autres animaux à la présence du poison typhique dans l'organisme, il était naturel de le préférer dans les recherches actuelles.

Mes tentatives pour obtenir à volonté une accoutumance intestinale régulière au poison typhique se heurtèrent d'abord à quelques difficultés, dues à l'introduction inévitable de la toxine dans l'organisme. Ce dernier reste plus ou moins bien vacciné, et l'inoculation ultérieure du virus n'est pas suivie de l'infection générale si typique que j'ai décrite, à plusieurs reprises, chez le cobaye.

Mais, après un certain nombre d'essais, je suis enfin arrivé à trouver un moyen aussi simple que sûr pour atteindre le but que je m'étais proposé.

En injectant dans l'estomac des cobayes, dans le cours de quelques jours, la quantité de cultures typhiques stérilisées qui aurait été suffisante pour les vacciner solidement, et dans la même période de temps, si on la leur eût injectée sous la peau, on obtient une accoutumance de l'intestin à la toxine du bacille d'Eberth, sans modifier en rien la réceptivité des cobayes à l'infection générale produite par l'inoculation ultérieure du virus.

Dans mes recherches je procédais de la manière suivante :

Après avoir fait deux lots de cobayes, je leur administrais

chaque jour, et 5 jours de suite, 4 c. c. d'une culture de bacilles typhiques en bouillon glycériné, resté pendant un mois dans l'étuve à 37° et ensuite stérilisé à 120°.

Pour le premier lot, on introduisait le liquide vaccinal dans l'estomac, au moyen d'une petite sonde ; pour le second, on l'injectait directement sous la peau, comme cela se pratique pour les vaccinations ordinaires (voir appendice n° 1).

Lorsqu'on connaît le pouvoir immunisant des liquides vaccinaux qu'on emploie, on peut interrompre le traitement après une période déterminée ; mais, en cas contraire, la seconde série d'animaux pourra toujours indiquer à quelle dose le liquide vaccinal atteint sa limite exacte d'efficacité.

Les miens immunisaient les cobayes à des doses même inférieures à 20 c. c., mais j'administrerais d'ordinaire cette quantité, car quelques cobayes du lot inoculé sous la peau finissaient toujours par mourir, et cela me démontrait, mieux que toute autre inoculation d'essai faite avec le virus, que la dose vaccinante du liquide administré avait été atteinte, et que la limite de tolérance commençait à être dépassée. Après avoir terminé, de cette manière, la préparation des animaux, on les pesait de nouveau, et on trouvait, régulièrement, que ceux de la première série avaient perdu bien peu de leur poids initial, peut-être autant par l'effet de la courte diète qu'on leur imposait une quinzaine d'heures avant l'injection gastrique, pour qu'elle trouvât l'estomac vide, que par l'effet de cette injection elle-même. Au contraire, les cobayes du second lot avaient beaucoup maigri, comme on l'observe toujours après chaque vaccination excessivement prolongée.

Bien que ce poison versé dans l'estomac semble passer sans être mis en évidence par un réactif aussi sensible que l'est celui de la vaccination et de l'amaigrissement, il rend cependant les parois intestinales incapables de toute réaction, même lorsque le virus typhique fabrique sa toxine dans l'organisme, comme dans la fièvre typhoïde expérimentale.

En effet, les cobayes qui ont reçu le poison typhique par voie gastrique, lorsqu'ils sont inoculés dans le péritoine, même avec de petites doses d'une culture virulente du bacille d'Eberth, meurent en 8, 12, 24 heures, exactement comme les cobayes de contrôle, inoculés en même temps, mais sans présenter ni ce

fort météorisme ni cette excessive sensibilité abdominale qui, chez les cobayes neufs, représentent les symptômes objectifs les plus marqués de l'infection et de l'intoxication typhiques : le facies de la maladie est changé, et il en est de même des résultats de l'examen anatomique.

La cavité péritonéale est presque toujours privée d'excès d'excès liquide ; les masses intestinales sont pâles, brunâtres, sèches : aucune trace des processus congestifs ordinaires. Leur surface est sillonnée par les mailles d'un excès fibrino-purulent, constitué par une quantité énorme de bacilles typhiques et de leucocytes.

Le contenu intestinal est, généralement, visqueux et privé entièrement de ces amas d'éléments cellulaires de toute nature qui caractérisent l'entérite typhique aiguë ordinaire.

La rate est habituellement petite et flasque ; l'utérus, au contraire, est souvent un peu congestionné.

Dans le tableau suivant, je rapporte sommairement, les unes en face des autres, les notes les plus caractéristiques de deux infections obtenues : la première chez un cobaye neuf et la deuxième chez un cobaye ayant l'intestin accoutumé au poison typhique.

Je n'y indique que les caractères typiques, car dans l'accoutumance intestinale au poison typhique il peut y avoir de petites variations comme dans la fièvre typhoïde expérimentale.

EXPÉRIENCES COMPARATIVES SUR L'ACCOUTUMANCE DE L'INTESTIN AU POISON
TYPHIQUE DANS LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

HEURES	II. VII. COBAYE NEUF (gr. 310).	HEURES	II. VII. COBAYE AVEC INTESTIN ACCOUTUMÉ AU POISON (gr. 340).
8	<p>Injection intraperitoneale de 0^{emc},5 d'une culture en bouillon virulente.</p> <p>SYMPTOMATOLOGIE</p> <p>Fort météorisme abdominal, accompagné d'excessive sensibilité douloureuse.</p>	8	<p>Injection intraperitoneale de 0^{emc},5 d'une culture en bouillon virulente.</p> <p>SYMPTOMATOLOGIE</p> <p>Aucun météorisme abdominal, avec absence complète de sensibilité douloureuse.</p>
22	<p>Mort après 14 heures.</p> <p>EXAMEN ANATOMIQUE</p> <p><i>Cavité péritonéale</i> : exsudat liquide, hémorragique, très riche en microbes et presque privé de cellules, congestion très forte de toute la séreuse.</p> <p><i>Intestins</i> : excessivement congestionnés et ecchymotiques, les parois sont dilatées et flasques, les glandes lymphatiques grossies et congestionnées, la muqueuse est détruite, le contenu entérique est abondant, diarrhéique et hémorragique.</p> <p><i>Rate</i> : un peu grossie.</p> <p><i>Uterus</i> : très congestionné.</p>	20	<p>Mort après 12 heures.</p> <p>EXAMEN ANATOMIQUE</p> <p><i>Cavité péritonéale</i> : absence d'exsudat liquide, aspect très pâle de toute la séreuse abdominale, plusieurs flocons fibrino-purulents entre les anses intestinales.</p> <p><i>Intestins</i> : parfaitement normaux, secs, anémiques ; muqueuse intacte, contenu entérique normal.</p> <p><i>Rate</i> : un peu grossie.</p> <p><i>Uterus</i> : un peu congestionné.</p>

Le phénomène de l'accoutumance intestinale au poison typhique, chez le cobaye de la deuxième expérience, apparaît donc très évident, c'est pourquoi je crois inutile d'insister plus longuement sur les particularités qui l'accompagnent.

Le but désiré, c'est-à-dire de rendre insensible à la toxine du bacille d'Eberth, cet organe qui, dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale, reste le plus gravement frappé, est donc expérimentalement atteint, et s'il n'est pas encore possible d'indiquer le processus biologique du phénomène, on peut, pourtant, supposer qu'il doit se développer et s'accomplir dans les cellules

et dans les organes de l'intestin qui, d'ordinaire, réagissent et se montrent sensibles à l'influence du poison typhique, c'est-à-dire dans les lymphocytes, dans les follicules lymphatiques et peut-être aussi dans l'épithélium intestinal lui-même.

III

LA NATURE DE L'ACCOUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE

J'ai désigné jusqu'ici, sous le nom d'*accoutumance intestinale*, la faculté qu'ont les parois intestinales de rester insensibles au poison typhique, en la prenant comme un fait. Resterait maintenant à savoir de quoi elle dépend.

J'ai déjà démontré que les cultures stérilisées du bacille typhique vaccinent aussi l'organisme contre l'infection par le *B. coli*.

En outre, bien que j'aie déjà cherché à exclure cette hypothèse, on peut se demander si les lésions intestinales de l'infection ou de l'intoxication typhique ne dépendent pas plutôt de l'action du *B. coli* intestinal lui-même, devenu tout à coup virulent, que de celle du poison spécifique. Dans ce cas, on pourrait admettre que l'injection gastrique du poison typhique détermine la vaccination et non l'accoutumance des cellules intestinales. La conséquence de cette vaccination locale serait l'immunité intestinale contre l'action pathologique du *B. coli*.

Enfin, il reste encore à décider une seconde question. Étant admis que l'immunité des parois intestinales, dans la fièvre typhoïde expérimentale, fût l'effet, non d'une vaccination locale contre le *B. coli*, mais d'une simple accoutumance au poison typhique, quelle était la nature de cette accoutumance ? Est-elle le résultat d'une action spécifique, exclusivement propre au poison du bacille d'Eberth, ou bien doit-on la regarder comme un phénomène général, commun à tous les poisons microbiens ?

Pour répondre à ces deux questions, il fallait trouver des poisons microbiens qui, introduits dans l'organisme, ne vaccinent ni contre le bacille typhique, ni contre le *B. coli*, mais, cependant, accoutumant l'intestin à tolérer impunément la toxine du bacille d'Eberth.

Je suis arrivé à ce résultat en me servant d'une macération

de 330 grammes de viande de bœuf, finement triturée, dans un litre d'eau, abandonnée vingt-cinq jours dans une étuve à 37°. Au bout de ce temps, j'ai trouvé, surnageant le dépôt, un liquide très limpide, d'une odeur excessivement désagréable et pénétrante, qui a été filtré et stérilisé à 120°.

Je choisis alors huit cobayes de grosse taille, et je les soumis journallement à l'inoculation sous-cutanée, à doses toujours croissantes, de ce liquide, expérimentant d'abord le pouvoir toxique, qui m'apparut immédiatement très faible (voir appendice n° 2).

En effet, bien que chacun de ces cobayes, dans l'espace de quinze jours, eût reçu, sous la peau, 30 c. c. de ce liquide, on eut une diminution de poids très inférieure à celle qui se serait produite à la suite de l'injection du poison typhique.

*Les cobayes préparés de cette manière n'avaient acquis aucune immunité, ni contre la fièvre typhoïde expérimentale, ni contre l'infection déterminée par le *B. coli*; mais ils avaient acquis l'accoutumance intestinale classique contre le poison typhique.*

L'inoculation intra-péritonéale des bacilles d'Eberth tuait, en effet, ces animaux accoutumés, dans le même espace de temps, avec la même diffusion des microbes dans l'organisme que chez les animaux de contrôle. Par contre, il y avait tout aussi peu de traces de réaction inflammatoire de la part de l'intestin que chez les cobayes préparés au moyen de l'ingestion gastrique de la toxine typhique.

Dans ce cas, il ne pouvait donc s'agir ni d'une vaccination locale, ni d'une accoutumance spécifique à un poison de la même nature. Le poison putride, inoculé sous la peau, s'était peu à peu éliminé par la surface intestinale, ou, du moins, il avait agi si activement sur elle qu'il en avait rendu les éléments complètement insensibles à l'action d'un poison beaucoup plus actif, tel que celui du bacille d'Eberth.

L'accoutumance intestinale au poison typhique ne peut par conséquent être considérée comme un phénomène particulier à ce poison. Évidemment, les parois intestinales réagissent d'autant moins à l'influence des poisons microbiens qu'elles sont plus habituées à les éliminer ou à en subir l'action.

L'accoutumance intestinale contre la fièvre typhoïde, obtenue avec les poisons de la fermentation putride, en constitue l'exemple expérimental le plus remarquable.

L'accoutumance intestinale obtenue avec les injections gastriques de toxines typhiques est de courte durée; déjà au bout de dix, quinze jours, les cobayes inoculés et qui meurent d'infection typhoïde, commencent à présenter de nouveau tous les viscères abdominaux un peu congestionnés. L'accoutumance obtenue avec les inoculations de poisons putrides se maintient, au contraire, plus longtemps, et semble beaucoup plus stable et plus complète, tout en restant naturellement liée à la quantité des poisons introduits et à la durée de la période préparatoire.

Mais il y a une autre particularité concernant précisément les cobayes qui meurent d'infection typhique, après avoir été préparés à l'accoutumance intestinale du poison avec les produits de la fermentation putride.

Chez ces animaux on ne constate aucune réaction intestinale; les masses intestinales apparaissent anémiques, sèches, peut-être encore plus pâles qu'à l'état normal; mais d'autres muqueuses, telles que celles de l'utérus et de la trachée, se présentent avec les caractères congestifs plus ou moins graves que nous avons signalés dans l'intoxication typhique des cobayes neufs.

Tout cela fait croire que l'accoutumance des cellules aux poisons microbiens s'obtient de préférence dans les parois intestinales parce que c'est à travers celles-ci, ou sur elles, que ces poisons s'éliminent ou exercent une action vraiment active. Ce fait trouve encore une confirmation dans les données fournies par les cobayes qui, après avoir été précédemment vaccinés, ont perdu ensuite, avec le temps, l'immunité, et peuvent succomber à la suite des inoculations du virus typhique.

Il est impossible d'établir des limites à la durée de l'immunité vaccinale contre l'infection typhique; quelle que soit la méthode employée pour l'obtenir, elle peut être plus ou moins grande, suivant la force du virus avec lequel on en essaie la résistance, et suivant la réceptivité individuelle.

Néanmoins, il est à supposer qu'elle ne se maintient pas très longtemps; environ deux mois après, elle commence à disparaître, et les animaux déjà solidement vaccinés et éprouvés contre un virus actif finissent par succomber régulièrement aux doses ordinaires des cultures typhiques.

Toutefois, le résultat de l'examen abdominal à l'autopsie de

ces cobayes n'est jamais celui de la fièvre typhoïde expérimentale typique. La réaction intestinale fait entièrement défaut; il n'y a ni congestions, ni hémorragies, ni traces d'entérite toxique; l'intestin est normal comme celui des cobayes soumis à l'accoutumance locale, soit avec les produits de la fermentation putride, soit avec l'ingestion du poison typhique (voir appendice n° 3).

Ces faits démontrent que : *les cultures stérilisées du bacille d'Eberth, injectées peu à peu dans l'organisme, produisent, outre la vaccination générale, l'accoutumance intestinale au poison typhique.*

Et, puisque cette dernière peut se conserver encore après que la première a été perdue, on doit supposer que *ce sont précisément les cellules intestinales qui ressentent avec le plus d'efficacité et, par conséquent, d'une manière plus stable, les effets de la toxine typhique.*

Tout cela n'est d'ailleurs qu'une confirmation plus complète de ce que nous avons dit jusqu'à présent touchant l'action élective de ce poison sur l'intestin de l'homme et des animaux sensibles.

..

Nous avons vu plus haut que le poison typhique, injecté directement dans l'intestin, ou bien n'est presque pas absorbé dans l'organisme, ou bien est absorbé, modifié et privé de son pouvoir toxique.

Pour essayer de voir les causes de cette innocuité, j'ai injecté à quelques petits cobayes les toxines si actives qui m'ont déjà servi dans d'autres recherches, et qui peuvent tuer les plus gros cobayes à la dose sous-cutanée de 1,5 c. c. par chaque 100 grammes de poids.

Chez trois cobayes, du poids de 180, 210 et 255 grammes, avec une injection gastrique de 4, 8, 15 c. c. d'un liquide si actif, je ne parvins à observer aucun signe de maladie, pas même une déviation sensible de la courbe thermique journalière normale.

L'insensibilité des parois intestinales envers une substance qui manifeste une action si énergiquement élective sur elles lorsqu'elle y arrive par la voie de la circulation générale, est

certainement un fait remarquable, qui n'a point d'analogie en microbiologie, si l'on en excepte celui qui a été observé par Charrin¹ à propos du poison du bacille pyocyanique.

Ce savant a démontré que l'injection de 60-80 c. c. d'une culture stérilisée du *B. pyocyanique* dans les veines de l'oreille d'un lapin, amène une forte diarrhée intestinale au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures; si, au contraire, on fait ingérer à l'animal la même culture stérilisée, la diarrhée n'apparaît nullement. Suivant Charrin, la porte d'entrée du poison posséderait, à cet égard, une influence comparable à celle qu'on observe pour le microbe vivant; en effet, on sait que le *B. pyocyanique* n'est pas pathogène lorsqu'il pénètre par la voie intestinale, tandis qu'il produit la mort quand il envahit l'organisme par la voie de la circulation générale.

Si nous voulions pousser plus loin encore les analogies biologiques, déjà si étroites d'autre part, entre la maladie pyocyanique et l'infection typhique expérimentale, nous devrions arriver à la même conclusion en ce qui concerne la fièvre typhoïde humaine, c'est-à-dire que le virus de la fièvre typhoïde exerce-rait son action pathogène ailleurs que dans l'intestin; *la fièvre typhoïde ne serait donc pas une infection intestinale*.

Cette théorie qui, à première vue, semble heurter toutes les idées régnantes sur l'étiologie de la fièvre typhoïde humaine, concorde parfaitement d'autre part avec ce qui est ressorti continuellement de nos recherches.

Nous avons déjà eu l'occasion de constater que, pendant la vaccination contre la fièvre typhoïde, les microbes tendent à disparaître du contenu intestinal, tandis que, chez les cobayes qui succombent à l'infection ou à l'intoxication typhique, ils subissent une excessive multiplication et deviennent virulents. Nous avons, en outre, cherché à expliquer ces deux faits, et nous avons trouvé que, dans le premier cas, la destruction des microbes est très probablement l'œuvre des cellules intestinales, tandis que, dans le second cas, entrerait en jeu l'action directe de la toxine typhique.

1. *La maladie pyocyanique*, Paris, Steinheil, 1889, p. 67.

Il reste donc à étudier maintenant comment se comportent les microbes intestinaux chez les cobayes dont l'intestin est accoutumé au poison typhique, et chez ceux qui meurent de fièvre typhoïde expérimentale sans aucune réaction de la part du canal digestif. Pour savoir comment se comportent les microbes dans l'accoutumance intestinale, j'ai tué deux cobayes accoutumés, et j'ai étudié, par le procédé décrit dans mon précédent mémoire, le contenu de l'intestin grêle, lequel, comme on le sait, est non seulement le point d'élection préféré du poison typhique, mais encore la portion du canal digestif la plus favorable à des études de cette nature.

Les plaques de gélatine lactosée au tournesol, même faites avec des dilutions concentrées de matière intestinale, restèrent, dans les deux cas, complètement stériles, et les cultures en trait sur gélose,ensemencées avec des anses de platine chargées de matière intestinale, ne donnèrent que de rares colonies *coliformes* à développement très lent.

Les inoculations de ces microbes *coliformes*, sous la peau des cobayes, restèrent invariablement sans résultat.

Il ressort de là que, dans l'accoutumance intestinale également, on observe les mêmes phénomènes que dans la vaccination de l'organisme contre l'infection typhique, c'est-à-dire que les microbes intestinaux, représentés presque exclusivement par les espèces *coliformes*, tendent à disparaître de l'intestin grêle.

Au contraire, lorsque les cobayes, même doués d'une solide accoutumance intestinale, meurent d'une infection typhique généralisée, on retrouve les microbes *coliformes* extraordinairement augmentés en nombre et très virulents.

Si l'on considère ensuite que, dans ce cas, les microbes se multiplient et deviennent virulents, bien que l'intestin reste indemne de la moindre lésion typhique, on conclura que les modifications biologiques des espèces intestinales doivent être attribuées plutôt à l'action directe de la toxine typhique qu'à des altérations anatomiques particulières des parois intestinales.

Il n'est pas sans intérêt de remarquer la coïncidence de ces trois faits qui, tout d'abord, sembleraient inconciliables entre eux : présence de la toxine typhique dans l'organisme, virulence des microbes intestinaux, et absence de la diarrhée et des lésions concomitantes de la muqueuse digestive.

Il y a évidemment là une autre confirmation de ce que nous avons rappelé en commençant, c'est-à-dire de l'existence chez l'homme de fièvres typhoïdes que n'accompagne aucune lésion anatomique ou symptomatologique de l'appareil digestif.

IV

L'IMMUNITÉ CONTRE LA FIÈVRE TYPHOÏDE. — LE PRÉTENDU POUVOIR BACTÉRICIDE ET ANTITOXIQUE DU SÉRUM. — L'ACTION DES PHAGOCYTES

La fièvre typhoïde ressemble si peu aux maladies que l'on a récemment étudiées au point de vue de l'immunité, que cette étude s'imposait aussi pour elle.

Sur l'immunité contre la fièvre typhoïde expérimentale, nous possédons déjà quelques recherches de Bitter¹, de Stern² et de Bruschettini³, qui se sont bornés à l'examen d'une théorie autrefois en faveur, mais aujourd'hui bien ébranlée, la théorie humorale. Comme causes exclusives de l'immunité contre la fièvre typhoïde, ils ont invoqué soit le *pouvoir bactéricide*, soit le *pouvoir antitoxique* du sérum.

Relativement au *pouvoir bactéricide* du sérum, Stern a comparé les sérums de cinq convalescents de fièvre typhoïde avec des sérums d'autres malades qui n'avaient jamais eu cette affection, et il a vu que non seulement les premiers n'étaient doués d'aucun pouvoir bactéricide, mais que cette propriété apparaissait beaucoup plus évidente dans les derniers.

Néanmoins, Bruschettini est parvenu à la mettre en évidence, dans quelques recherches exécutées avec du sérum de lapins normaux et avec du sérum de lapins vaccinés. Contrairement à ce que Stern a obtenu chez l'homme, Bruschettini trouve au sérum de lapins immunisés une action bactéricide beaucoup plus forte que celle du sérum normal; elle serait capable de détruire, en douze heures, tous les microbes ensemencés.

Ces savants, en désaccord au sujet des propriétés microbiocides, s'accordent au contraire à reconnaître au sérum des

1. Ueber Festigung von Versuchstieren gegen die Toxine der Typhusbacillen (*Zeitschr. f. Hygiène*, 1892, p. 298).

2. Ueber Immunität gegen Abdominaltyphus (*Deutsche Med. Wochenschrift*, 1892, n° 37).

3. Sulla Immunità contro il tifo (*Riforma Medica*, 1892, n° 481).

animaux vaccinés contre le bacille typhique des propriétés antitoxiques comparables à celles du sang des animaux vaccinés contre le tétranos et la diphtérie.

Bitter, Stern et Bruschettini ont employé, pour démontrer cette action antitoxique du sérum, des méthodes différentes, sur lesquelles nous insisterons un peu, à raison de la nature même de nos recherches.

Bitter évapore au 1 : 10, dans le vide, des cultures typhiques en bouillon glycériné à 50°, et obtient ainsi un liquide qui tue, sans exception, les lapins de 1,200-1,700 grammes, à la dose de 0,5 à 0,7 c. c. Il injecte ce liquide dans les veines de 20 lapins à doses croissantes, à partir de 0,1 c. c. jusqu'à 1 c. c.

Durant ce traitement, 15 lapins succombent, et comme les 5 autres sont survécu à l'injection d'une dose de toxine mortelle pour les lapins neufs, Bitter déclare avec raison qu'ils ont acquis une certaine résistance au poison typhique.

Attribuant cette résistance à une propriété antitoxique acquise par le sérum, il mêle 10 c. c. de ses toxines avec 10 c. c. de sérum retiré de ces lapins, et il inocule 2 c. c. de ce mélange à un lapin qui survit, tandis que succombe le lapin de contrôle inoculé avec la seule dose de toxine. De là, il conclut à l'existence d'une antitoxine capable de détruire le poison typhique.

Toutefois, cette conclusion ne s'impose pas ; car cette résistance de 5 lapins sur 20, après quarante-quatre jours d'injections lentement croissantes, à une dose de poison très peu supérieure à la dose mortelle, semble provenir bien plus d'une simple accoutumance à la toxine que de l'existence d'une propriété antitoxique du sérum.

Metchnikoff et Roudenko¹ ont produit chez leurs cobayes une accoutumance encore plus marquée vis-à-vis des toxines vibrionniennes, et cependant leurs cobayes vaccinés contre le vibrion avicide ne possédaient pas un sérum antitoxique.

Quelle différence entre ces animaux possédant l'accoutumance et les animaux vaccinés par Behring et Kitasato contre le tétranos, animaux qui supportent facilement des doses vingt fois plus grandes que celles qui tuent les animaux neufs.

Relativement à l'inoculation d'épreuve, on peut se demander

1. *Loc. cit.*

enfin si une seule expérience suffit, surtout avec des animaux d'une sensibilité si inconstante envers la toxine typhique, et avec une dose毒ique de si peu supérieure à la dose mortelle¹.

Les recherches de Stern semblent plus démonstratives. Il emploie du sérum de convalescents de fièvre typhoïde, le mélange avec des doses toxiques de cultures typhiques stérilisées, et démontre l'innocuité de ces mélanges chez les souris blanches.

La souris réagit d'une manière très inconstante envers le poison typhique, et Stern aurait mieux fait de s'adresser à des animaux un peu plus adaptés pour des expériences de cette nature. De plus, un passage d'une de ses publications récentes² soulève quelques doutes sur l'existence de cette propriété antitoxique dans le sérum des convalescents de fièvre typhoïde.

Stern, en effet, s'exprime ainsi : « Si nous mélangeons une culture virulente de *B. typhique* et de sérum immunisant, par exemple dans la proportion de 1 : 10, nous pouvons tout d'abord injecter à nos animaux une quantité même supérieure à la dose mortelle, sans qu'il apparaisse de symptômes de maladie. Si, au contraire, nous laissons pendant quelques jours le mélange dans l'étuve, les bacilles se multiplient et il suffit de la dixième partie de la dose, qui d'abord ne pouvait produire la maladie, pour tuer les animaux. »

Il est clair que, dans le premier cas, le mélange devait, en effet, être inoffensif; car, avec la dose mortelle du *cirus*, était inoculée une certaine quantité de sérum immunisant, lequel, comme on le sait, est doué d'énergiques propriétés thérapeutiques. Il ne s'agit donc nullement encore d'un phénomène antitoxique.

Dans le second cas, au contraire, le mélange étant resté pendant quelques jours dans l'étuve, il s'était produit, évidemment, une certaine quantité de poison, d'autant plus que le sérum de sang constitue un milieu plus favorable au développement et à la toxicité des cultures que les liquides nutritifs ordinaires. Par conséquent, comme Stern, dans ses observations, employait toujours les souris, lesquelles, le plus souvent, sont extrêmement

1. BRIEGER, KITASATO et WASSERMANN, eux aussi, déclarent explicitement que « les lapins sont très résistants à l'intoxication typhique et par conséquent tout à fait inadaptés pour de semblables recherches ». (*Zeitschr. für Hygiene*, 1892, p. 135.)

2. Ueber einige Beziehungen zwischen menschlichen Bluts serum und pathogenen Bakterien (*Verhandl. des Zwölften Congress für innere Medicin*, avril 1893, p. 286).

sensibles à l'injection *intraperitoneale* de toxine typhique, il n'y a pas à s'étonner si tous les animaux succombaient, même aux petites doses du mélange devenu réellement toxique.

C'est pourquoi il est difficile d'admettre, dans ce sérum, la présence du moindre pouvoir antitoxique, car il ne se serait ni affaibli ni détruit, soit par la multiplication des microbes, soit par la faible température de l'étuve. Toutes les souris de Stern auraient dû, dans ce cas aussi, rester vivantes.

Les expériences de Bruschettini partent d'un principe que nous ne pouvons, aujourd'hui, regarder comme exact, à savoir que, si on supprime la toxicité des cultures typhiques, elles sont inoffensives. Par conséquent, il ne se préoccupe jamais d'éliminer les microbes des cultures, et il mêle directement 1 c. c. de celles-ci avec 2 c. c. de sérum obtenu d'un lapin qu'il regarde comme immunisé.

Après cela, il place le mélange dans l'étuve à 37°. Au bout de six heures, il inocule un premier lapin, lequel meurt après trois jours, comme le lapin de contrôle, inoculé avec des cultures pures; au bout de douze heures, il inocule un deuxième lapin, qui meurt également sept jours après le lapin de contrôle; enfin, au bout de vingt-quatre heures, il inocule un troisième lapin qui survit, tandis que le lapin de contrôle meurt deux jours après. De ces seuls résultats, Bruschettini conclut, que le poison typhique a ressenti une *action très marquée* par l'effet du sérum.

Il est clair, cependant, que ces résultats n'ont rien d'analogue avec ce qu'on observe d'ordinaire quand on a affaire à un véritable pouvoir antitoxique. L'auteur ne nous dit pas si les animaux moururent d'infection ou d'intoxication; mais la petite dose employée (1 c. c. de culture) exclut ce dernier cas. D'autre part, aujourd'hui on ne peut admettre que les bacilles d'Eberth ne soient pas en état de se multiplier dans l'organisme; au contraire, ils peuvent parfois déterminer, chez les lapins, de véritables infections de forme septicémique¹.

Outre cela, Bruschettini n'a pas pensé que le sérum vaccinal pouvait exercer, avant tout, une *action thérapeutique*.

La méconnaissance de cette action thérapeutique et l'idée que les bacilles typhiques, suivant l'ancienne théorie de Beumer et Peiper, ne devaient pas être considérés par eux-mêmes comme

1. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, nov. 1892, p. 739.

pathogènes, ont suggéré à l'expérimentateur une conclusion non justifiée.

Il est même étrange que, dans ses expériences, Bruschettini ait dû compter quelques insuccès, et, puisque ses animaux d'expérience, ainsi que les animaux de contrôle, ont évidemment succombé à une infection, il faut penser que le sérum mêlé aux *cultures* ne manifestait pas une action assez thérapeutique, et que, par conséquent, le lapin dont il avait pris ce sérum n'était pas encore bien vacciné contre le bacille d'Eberth.

La question du pouvoir antitoxique du sérum des animaux vaccinés contre l'infection typhique reste donc entière, et j'ai cherché à l'élucider.

Comme il est désormais superflu de chercher à établir un lien entre le pouvoir bactéricide *in vitro* et le phénomène de l'immunité, le sérum des animaux vaccinés pouvant fournir d'abondantes cultures de bacilles typhiques, j'ai préféré observer ce qu'il advient du bacille d'Eberth inoculé dans l'organisme rendu réfractaire. Son lieu d'élection, qui est en même temps le point d'inoculation le plus vulnérable, est la cavité péritonéale. C'est pourquoi, à quelques cobayes bien vaccinés, j'inoculai, dans le péritoine, 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tuait, d'ordinaire, en 18-24 heures (voir appendice n° 4).

Naturellement ces cobayes survécurent tous ; mais j'en tuai deux au bout de quarante-huit heures, deux autres au bout de trois jours, et le dernier, au bout de six jours, tirant de nouveau, de la cavité péritonéale de chacun, des cultures pures de bacilles typhiques qui, après s'être développées en bouillon, pendant 24 heures dans l'étuve, étaient successivement inoculées à la dose de 1 c. c. dans le péritoine d'autant de cobayes neufs.

Les premiers de ces cobayes (c'est-à-dire ceux qui avaient reçu les cultures obtenues du péritoine des cobayes tués au bout de quarante-huit heures) moururent d'infection typhique au bout de 16-18 heures ; les seconds cobayes (qui avaient reçu les cultures obtenues du péritoine des cobayes tués au bout de trois jours), moururent également d'infection au bout de 10-12 heures ; le troisième cobaye (qui avait reçu la culture tirée du péritoine du cobaye tué au bout de six jours), mourut également d'infection au bout de huit heures, présentant à l'examen abdominal le tableau le plus caractéristique qu'il m'ait été donné d'observer

durant mes nombreuses recherches sur la fièvre typhoïde expérimentale. Son intestin grêle, spécialement, portait les traces d'une action toxique si violente, qu'il y en avait des portions d'une couleur ardoisée, qui non seulement semblaient congestionnées ou hyperhémiques, mais encore absolument gangrénées.

L'hypertrophie des plaques de Peyer était si fort développée que je m'en suis servi pour faire des préparations histologiques, qui sont des meilleures de ce genre que j'aie jamais obtenues.

Ces résultats prouvent en tout cas, mieux que toute autre recherche exécutée *in vitro*, que les humeurs d'un animal vacciné contre l'infection typhique ne sont en état ni de tuer ni d'atténuer les bacilles d'Eberth. Au contraire, ils confirment la loi déjà démontrée pour d'autres microbes, et, dans ce cas spécial, constatée *in vitro* également par Stern¹, à savoir: *que dans l'organisme, des animaux vaccinés contre la fièvre typhoïde, les bacilles d'Eberth conservent longtemps leur vitalité et exaltent progressivement leur virulence.*

Pour étudier l'éventuelle action antitoxique du sérum, j'ai eu recours d'abord à quelques expériences exécutées à peu près de la même manière.

Après avoir choisi des cobayes bien vaccinés et éprouvés avec un virus très actif, je les inoculais, en même temps qu'autant de cobayes de contrôle, avec des doses mortelles d'un liquide toxique qui tuait à la dose de 1,5 c. c. par 100 grammes du poids de l'animal, et qui m'avait déjà servi dans les recherches sur la toxine typhique, exposées dans mon précédent mémoire (voir appendice n° 5).

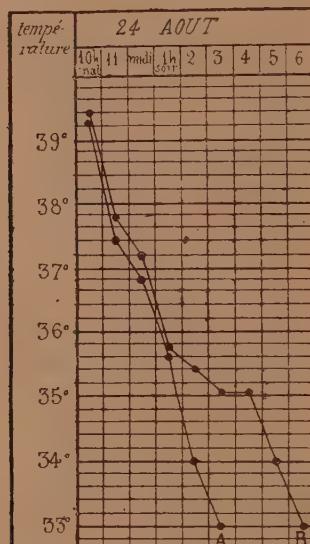
Or, dans toutes ces expériences, non seulement j'obtins la mort des animaux, — ce qui ferait supposer que, dans l'organisme des cobayes vaccinés, il n'existe aucune substance capable de neutraliser ou de détruire le poison typhique, — mais les animaux vaccinés moururent presque toujours quelques heures avant ceux de contrôle, présentant une rapide hypothermie sans pauses et sans oscillations.

Les tracés graphiques suivants, empruntés à une de ces recherches, montrent les différences de deux courbes hypother-

4. *Loc. cit.*, p. 290.

miques, qui indiquent que les cobayes vaccinés sont beaucoup plus sensibles à la toxine typhique que les cobayes de contrôle non vaccinés.

Dans ce cas encore se reproduit donc le phénomène découvert par Charrin et Gamaléia¹, d'après lesquels les animaux



Courbe hypothermique d'un cobaye vacciné et inoculé avec la toxine typhique.

A. Cobaye vacciné (265 gr.). Injection sous-cutanée de 4 c. c. de toxine (1,5 0/0 du poids du corps)
B. Cobaye de contrôle (270 gr.). injection idem.

vaccinés contre la maladie pyocyanique seraient beaucoup plus sensibles au poison de ce microbe que les animaux non vaccinés.

Ce phénomène, comme on le sait, fut ensuite confirmé également par Metchnikoff², chez les lapins vaccinés contre le Hog-Choléra, par moi³, chez les cobayes vaccinés contre le *vibron ariaire*, et par Issaeff⁴, chez les lapins vaccinés contre le pneumocoque.

Toutefois, dans l'empoisonnement typhique des cobayes

1. Vaccination et résistance aux poisons microbiens (*Comptes rendus de la Société de biologie*, 1890, n° 19, p. 294).

2. Immunité des lapins vaccinés contre le microbe du Hog-Choléra (*Annales de l'Inst. Pasteur*, 1892, p. 306).

3. Les moyens de défense de l'organisme contre les microbes (*Ibidem*, 1893, p. 238).

4. Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre le pneumocoque (*Ibidem*, 1893, p. 260).

vaccinés, on observait, en outre, quelques autres caractères que je crois opportun de signaler.

Tandis que les cobayes neufs présentent, comme on le sait, le tableau symptomatologique habituel, rapide météorisme, grande sensibilité abdominale, congestion intense de tous les viscères et surtout de l'intestin, entérite aiguë hémorragique, hypertrophie des plaques de Peyer, etc., chez les cobayes vaccinés, au contraire, ces phénomènes sont très atténus ou font tout à fait défaut, et cela confirme l'idée que j'ai exprimée plus haut, au sujet de l'accoutumance intestinale à la toxine typhique.

Par conséquent, non seulement les cobayes traités par voie intestinale, mais encore les cobayes vaccinés contre le même virus, possèdent l'accoutumance intestinale au poison typhique. Cela démontre que le phénomène de l'accoutumance peut, parfois, se produire seulement dans une certaine catégorie de cellules.

Dans le cas actuel, de ce que les cobayes succombèrent malgré l'absence de réaction intestinale, on doit conclure que si l'accoutumance à la toxine typhique peut être obtenue dans l'intestin, elle n'est peut-être pas possible pour le système nerveux.

Ceci concorde avec ce qu'on observe exceptionnellement chez l'homme et ce qu'on obtient expérimentalement chez les animaux, c'est-à-dire : *la fièvre typhoïde sans lésions intestinales.*

* * *

Mais, si l'organisme des animaux vaccinés n'est pas en état de neutraliser ou de détruire la toxine typhique, cet important phénomène pourrait-il, au contraire, se produire *in vitro*, comme dans les cas observés par Bitter et par Stern ?

Le moyen de s'en assurer était de mélanger directement la toxine typhique au sérum de cobayes vaccinés, et d'inoculer le mélange à des cobayes neufs. La toxine employée tuait, comme je l'ai dit plus haut, à la dose de 1,5 c. c. par 100 grammes du poids de l'animal; le sérum était obtenu en saignant des cobayes très robustes et bien vaccinés.

J'ai fait ainsi cinq expériences sur les cobayes et douze sur les souris, et jamais le sérum des cobayes vaccinés ne mani-

festa le moindre pouvoir antitoxique. Tous les animaux, inoculés avec les mélanges les plus variés de sérum et de toxine, moururent, à l'exception de deux souris, avec les mêmes phénomènes et à peu près dans la même période de temps que les animaux de contrôle (voir appendice n° 6).

Cependant, quelques particularités observées chez les souris méritent de fixer notre attention, car elles présentent d'étroits rapports avec les expériences de Stern, desquelles ressortirait la propriété antitoxique du sérum.

J'ai déjà insisté ailleurs sur la sensibilité très variable des souris pour le poison typhique.

On sait que pour tuer une souris il suffit de 0,2 c. c. et parfois de 0,4 c. c. de toxine, en injection intrapéritonéale, tandis que souvent l'injection sous-cutanée de 0,8 à 1 c. c. n'est pas suffisante.

De plus, les souris inoculées dans le péritoine, même avec des quantités très petites de toxine, meurent avec une extrême rapidité, parfois en quelques heures, tandis que celles qui sont inoculées à fortes doses sous la peau ne meurent pas avant 18-24 heures; c'est-à-dire que les souris, qui ont reçu presque 5 c. c. de toxine pour 100 grammes de leur poids (le poids d'une souris est, le plus souvent, de 18-20 grammes), meurent plus tard que les cobayes, lesquels ne reçoivent pas plus de 1,5 c. c. par chaque 100 grammes du poids du corps. Les souris sont donc beaucoup plus résistantes que les cobayes au poison typhique.

Le même phénomène se produit quand on emploie les cultures vivantes. On observe, en effet, que deux gouttes seulement d'une culture injectée dans le péritoine tuent rapidement, tandis qu'il faut au moins 0,5 c. c. si l'injection est pratiquée sous la peau.

Outre cela, on trouve que, dans le premier cas, la mort est due à une péritonite très aiguë, presque sans diffusion des microbes dans l'organisme, tandis que, dans le second, a lieu une véritable infection générale.

J'ai mentionné ailleurs¹ des observations de cette nature, concluant que l'injection intrapéritonéale chez les souris produit la mort plutôt par l'effet de la péritonite que par l'infection microbienne.

Le péritoine des souris présente donc, vis-à-vis du poison

i. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 738.

typhique, une sensibilité locale exceptionnellement marquée ; c'est pourquoi, même sans qu'il soit besoin d'atteindre le rapport nécessaire entre la dose toxique et la sensibilité générale, les animaux peuvent succomber par la seule violence de la réaction locale.

Les choses étant ainsi établies, on comprend sans difficulté que, chez les souris, l'injection, dans le péritoine, d'une quantité de poison capable de produire la mort, puisse ne pas représenter effectivement la dose toxique, et que, par conséquent, ses effets puissent changer dans tous les cas où les conséquences de la réaction locale restent simplement mitigées.

Un de ces cas, par exemple, serait la dilution dans le sérum de sang. C'est peut-être là une des raisons pour lesquelles, dans les expériences de Stern, les souris qui recevaient l'injection intrapéritonéale de toxine mêlée avec du sérum, survivaient, tandis que les souris inoculées avec des toxines seules mouraient régulièrement.

Toutefois, dans mes expériences, ces effets probables de la dilution n'apparurent pas très manifestes.

Tous les animaux (à l'exception de deux souris), inoculés sous la peau ou dans le péritoine, avec des doses mortelles de toxines seules ou mêlées à du sérum, moururent régulièrement, et me donnèrent la conviction que : *le sérum des animaux vaccinés contre l'infection typhique n'est doué d'aucun pouvoir antitoxique contre le poison produit par le bacille d'Eberth.*

Restait toutefois à définir un autre problème susceptible d'être soulevé après les résultats de Bitter.

Le sérum employé par Bitter, dans sa dernière expérience, sur laquelle il appuie l'idée principale du pouvoir antitoxique, provenait d'un lapin qui, non seulement devait être vacciné, mais encore était habitué à tolérer une dose de poison supérieure à la dose strictement mortelle ; en d'autres termes, le sérum de Bitter appartenait à des lapins *hypervaccinés*.

Le hasard m'a fourni l'occasion de pouvoir observer aussi ce côté de la question.

Le sérum de lapin hypervacciné me fut fourni par un animal qui vivait depuis longtemps dans le laboratoire, et qui avait subi, à plusieurs reprises, l'injection de très fortes doses de toxines typhiques.

Ce lapin avait été vacciné l'année précédente avec 30 c. c. de cultures stérilisées, et m'avait déjà fourni un bon sérum thérapeutique, bien que, par l'effet de la vaccination et des successives inoculations d'essai, son poids fût tombé, en quelques jours, de 2,500 à 1,800 grammes.

Comme il survécut à la saignée, je trouvai, environ huit mois après, que ce même lapin avait excessivement augmenté : il pesait 4,600 grammes. Le 5 juillet, je commençai de nouveau à l'inoculer presque quotidiennement, avec 6-8-12 c. c. de cultures stérilisées ; c'est pourquoi, le 18 août, il en avait reçu au total, sous la peau, 154 c. c., quantité capable de tuer immanquablement, même à doses très fractionnées, quatre lapins de 2,000 grammes chacun.

Malgré cela, l'animal s'était maintenu en excellentes conditions ; il avait perdu seulement 80 grammes de poids ; il fut ensuite inoculé dans les veines avec 1 c.c. de culture virulente.

Dix jours après, je pratiquai la saignée et j'obtins une abondante quantité de sérum qui servit à mes expériences. Elles furent au nombre de trois, et je les pratiquai sur les cobayes voir appendice n° 7).

La quantité de toxine inoculée sous la peau fut toujours la dose mortelle *minima*, c'est-à-dire 1,5 c. c. 0/0 du poids ; la quantité de sérum mélangé fut, dans le premier et le second cas, du double, dans le troisième cas, du triple de la toxine.

Dans tous les cas, cependant, j'obtins régulièrement la mort des animaux, à peu près dans la même période de temps et avec les mêmes symptômes que ceux qui se produisirent chez les animaux de contrôle.

* * *

Bien que, dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale, les effets du poison élaboré par le bacille d'Eberth représentent le caractère prédominant de la maladie, cependant, il paraît naturel de conclure de ce que les animaux vaccinés ne sont pas immunisés contre l'intoxication, que *la fièvre typhoïde est une infection et non une intoxication*. C'est ce qui était déjà arrivé pour le choléra expérimental, à propos duquel a existé aussi, pendant longtemps, une divergence de concepts théoriques, qui a disparu

à la suite des travaux récents de Pfeiffer, de Wassermann¹ et Metchnikoff².

Et, puisque les théories humorales se sont montrées impuissantes à nous donner l'explication de l'immunité, il est naturel de rechercher les moyens de défense de l'organisme vacciné dans les éléments cellulaires mêmes. Cette étude de la réaction cellulaire, chez les animaux vaccinés contre la fièvre typhoïde expérimentale, est heureusement très facile.

Les bacilles d'Eberth trouvant, comme on le sait, dans la cavité péritonéale, un milieu très favorable à leur multiplication, c'est là qu'on doit étudier les réactions réciproques des cellules et des microbes.

Lorsqu'on inocule, dans le péritoine des cobayes, une culture virulente de bacilles typhiques, les animaux succombent en quelques heures, et présentent, dans la cavité péritonéale, un exsudat plus ou moins abondant où, parmi les microbes extraordinairement multipliés, ne se rencontrent que de très rares leucocytes. Il n'y a pas la moindre trace de réaction cellulaire.

Si, au contraire, on inocule la culture virulente dans le péritoine des cobayes bien vaccinés, ceux-ci pourront présenter, tout au plus, une hyperthermie transitoire, mais ils survivent, sans exception. En les tuant soit quelques heures après l'inoculation du virus, soit lorsqu'ils ont sûrement échappé à tout danger d'infection, c'est-à-dire au bout de trente-six à quarante-huit heures, ils ne présentent jamais d'exsudats; la cavité péritonéale est absolument vide. Une mince couche luisante et visqueuse revêt, cependant, la surface des viscères abdominaux, comme s'ils étaient recouverts d'une patine blanchâtre.

Si l'on examine au microscope une petite portion de cet exsudat, on trouve qu'il est presque exclusivement formé de leucocytes et de microbes endocellulaires.

Bargellini a fait une série complète de recherches sur cette question, et je renvoie à celles-ci le lecteur désireux de plus amples détails.

En suivant la méthode que j'ai déjà indiquée dans l'étude de

1. Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. (*Zeitschrift für Hygiene*, 1893, p. 46).

2. Recherches sur le choléra et les vibrions (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, p. 403 et 562).

l'immunité contre le *vibron aviaire*, Bargellini¹ inoculait le virus typhique à des séries de trois cobayes ; le premier cobaye était vacciné, le second était traité par un sérum préventif, et le troisième restait comme contrôle.

Après cela, il comptait les leucocytes du sang chaque deux heures et, dès que le cobaye de contrôle était mort, il tuait les deux autres, pratiquant l'examen et la numération des leucocytes dans l'xsudat péritonéal.

Je rapporterai seulement les chiffres d'une des nombreuses expériences de Bargellini. Ils indiquent le nombre des leucocytes retrouvés dans les exsudats péritonéaux des cobayes susdits :

	NOMBRE DES LEUCOCYTES POUR 1 c.c.		
	MONONUCLÉS	POLYNUCLÉS	TOTAL
1 ^{er} cobaye : vacciné	4,336	92,020	97,456
2 ^e cobaye : traité par du sérum.	6,100	78,400	84,240
3 ^e cobaye : contrôle	3,600	1,422	5,022

Ces chiffres sont par eux-mêmes assez éloquents. Non seulement ils nous fournissent la mesure de la prodigieuse réaction phagocytaire qui a lieu dans l'organisme vacciné, mais ils nous démontrent encore la valeur de l'intervention cellulaire dans la protection de l'organisme contre les microbes. Peu d'autres maladies expérimentales mettent aussi nettement le fait en évidence, et on trouverait difficilement un exemple plus démonstratif à l'appui de la théorie cellulaire de l'immunité.

Je crois inutile de m'arrêter à démontrer que les bacilles typhiques englobés par les phagocytes sont toujours virulents, puisque j'ai mentionné plus haut que, même au bout de six jours, il est possible de tirer, de l'xsudat d'un cobaye vacciné, un virus exceptionnellement actif sans qu'on trouve alors de bacilles libres dans le péritoine ; on sait du reste que les microbes conservent ou même exaltent leur virulence en passant par les animaux réfractaires.

1. Contributo allo studio della immunità vaccinale (*Rivista d'Igiene e Sanità Pubblica*, mai 1894).

V

B. TYPHIQUE ET *B. coli*.

La question concernant les rapports spécifiques entre ces deux microbes se trouve depuis quelques années à l'ordre du jour en bactériologie. Posée par l'école de Lyon, elle a fait l'objet d'une quantité énorme de recherches, que nous nous abstiendrons de résumer, mais qui disent assez l'intérêt et la difficulté d'un jugement définitif.

Dans les intéressants mémoires de MM. Macaigne¹, Wurtz², Malyoz³, Terni⁴, Cesaris-Demele et Orlandi⁵, on trouvera, résumés avec une grande exactitude, tous les caractères différentiels ou communs des deux microbes. Mais, à mon avis, il s'agit moins d'en multiplier à l'infini les ressemblances ou les différences superficielles, au moyen d'artifices de technique, que de démontrer pourquoi le *B. coli* virulent, et par conséquent pathogène, provoque chez l'homme, dans un cas, une maladie du type choléra (*cholera nostras*), et dans l'autre une maladie du type fièvre typhoïde, tandis que sa nature, et par conséquent les effets de ses toxines devraient être identiques. En d'autres termes, il convient de démontrer l'identité ou la différence entre les toxines du *B. coli* et du *B. typhique*.

Le simple cours de la température, chez l'animal empoisonné ou inoculé avec le virus, ne saurait être une base suffisante pour établir, comme l'ont fait Rodet et G. Roux⁶, l'identité de ces deux toxines.

Lorsqu'on inocule un animal avec une toxine microbienne, à dose rapidement toxique, ou qu'on l'infecte avec un virus rapidement mortel, la courbe de la température est presque toujours la même. Il y a une légère élévation immédiatement après l'in-

1. Le bacterium coli commune, son rôle dans la pathologie, Paris, 1892.

2. Le bacterium coli commun (*Arch. de Méd. expérimentale*, 1893, n° 1).

3. Recherches bactériologiques sur la fièvre typhoïde (*Mém. de l'Acad. de Méd. de Belgique*. T. IX. fasc. V.).

4. La diagnosi differenziale del bacillo del tifo (*Ann. dell'Ist. d'Igiene sper. di Roma*, Vol. III, fasc. 3).

5. Sulla equivalenza biologica dei prodotti del *B. coli* e del *B. tiphi*. (*Arch. per le Sc. med.*, 1893, n° 14).

6. Bacille d'Eberth et bacillus coli (*Archives de Méd. expérimentale*, 1892, n° 3).

fection, comme on pourrait d'ailleurs l'obtenir même avec une petite quantité de toxine, et ensuite la température descend toujours, plus ou moins rapidement suivant la dose inoculée et suivant la sensibilité des animaux. L'hyperthermie représente la réaction générale de l'organisme contre les effets du poison ; l'hypothermie ou le collapsus démontrent que l'organisme est vaincu et que toute résistance est finie.

Le choléra est une maladie apyrétique parce que l'empoisonnement est rapide ; la résistance est nulle, et par conséquent l'issue est fatale. La fièvre typhoïde se distingue par ses pyrexies caractéristiques, parce que l'intoxication est lente et peut être tolérée pendant quelque temps par l'organisme. Lorsque cette intoxication a atteint son *maximum* et que le corps succombe, entrent en scène, ici encore, l'hypothermie et les phénomènes de collapsus, comme dans toute autre intoxication aiguë, humaine ou expérimentale. Il est donc vain de chercher à différencier les deux microbes d'après les modifications thermogénétiques de leurs poisons respectifs.

Mais, dans la toxine typhique, nous avons appris à connaître une propriété qui, maintenant, pourrait difficilement être confondue avec celle d'autres poisons microbiens, c'est l'action élective, spécifique sur toutes les muqueuses en général, et sur la muqueuse intestinale en particulier. Nous avons étudié les phénomènes et les conséquences de ces lésions toxiques intestinales et nous avons enfin trouvé la manière d'en prévenir les animaux.

Pendant mes longues recherches sur les infections typhiques et sur les infections par le *B. coli*, j'avais pu me convaincre que l'identité des lésions anatomiques, décrites par tous les auteurs qui m'ont précédé dans l'étude de cette question, n'existe pas en réalité.

Il est difficile d'établir les limites qui séparent les unes des autres, surtout si les observations ne sont pas très nombreuses ; mais, après une grande quantité d'autopsies exécutées avec soin et dans les conditions d'expérience les plus variées, on arrive à conclure que, à parité de virulence et d'action toxique, les lésions des muqueuses, dans la fièvre typhoïde expérimentale, sont beaucoup plus graves que dans l'infection par le *B. coli*. Tout d'abord, cette dernière infection, au point de vue bactério-

logique, présente en général un caractère septique qui ne se trouve pas dans l'infection produite par le bacille d'Eberth, alors même que les deux virus ont été inoculés à l'état de virulence *maxima*, et qu'ils ont déterminé la mort dans la même période de temps.

Outre cela, dans l'infection par le *B. coli*, le point d'inoculation du virus présente d'ordinaire un œdème sanguinolent, une coloration rougeâtre, sale et diffuse, qu'on n'observe presque jamais dans l'infection par le *B. typhique*.

Le tableau toxique abdominal, au premier aspect, semble peu dissemblable si le virus a été inoculé dans le péritoine. Dans ce cas, les deux microbes déterminent toujours une périctonite plus ou moins grave, qui ressemble, à première vue, aux périctonites ordinaires. Mais, si on inocule le virus sous la peau, les effets changent notablement.

Dans la fièvre typhoïde expérimentale des cobayes, nous avons les graves lésions déjà décrites plus haut (paralysie et dilatation des parois intestinales, entérite hémorragique, etc.); dans l'infection par le *B. coli*, au contraire, malgré une grande congestion intestinale, et un certain degré d'infiltation dans les plaques de Peyer. — ce qui peut dissimuler, à première vue, l'existence de lésions identiques à celles qui sont déterminées par le poison typhique, — on n'a jamais le tableau complet et si grave que l'on observe dans la maladie aiguë déterminée par le bacille d'Eberth.

Ces observations, confirmées à de nombreuses reprises, m'avaient, pour cette raison, fait supposer que l'action du poison du *B. coli* sur la muqueuse intestinale, bien que s'exerçant dans une certaine mesure, comme celle de quelques autres poisons microbiens (poisons du vibrion aviaire, du *b. pyocyaneus*, etc.), ne manifestait cependant pas la violence si étroitement liée au processus biologique de la toxine typhique.

La démonstration de ce fait, par voie directe, présentait toutes les difficultés auxquelles on se heurte chaque fois qu'on doit établir des comparaisons qui ne sont pas toujours constantes ou sur lesquelles domine assez souvent le critérium personnel.

C'est pourquoi je recours à une méthode indirecte.

J'ai dit plus haut comment on peut accoutumer l'intestin des

cobayes à tolérer impunément la toxine typhique, en injectant pendant quelques jours, dans l'estomac de ces animaux, une certaine quantité de cultures typhiques stérilisées. On pouvait dès lors se demander s'il serait possible d'obtenir les mêmes résultats en injectant, dans l'estomac des cobayes, les cultures stérilisées du *B. coli*.

Cette question prend, d'autre part, un singulier intérêt; car, bien que le *B. coli* soit l'hôte habituel de l'intestin et y produise continuellement son poison et, peut-être, en quantités notables, les parois intestinales des cobayes neufs ne sont nullement accoutumées à l'action de la toxine typhique.

En présence de ce fait, on peut penser à une des hypothèses suivantes : ou bien le phénomène de l'accoutumance intestinale au poison typhique ne peut être obtenu que par voie expérimentale, ou bien, dans ce phénomène caractéristique, l'équivalence biologique des deux poisons ne s'observe pas.

Pour décider la question, j'ai eu recours au même procédé que j'ai déjà employé et décrit plus haut, pour obtenir l'accoutumance intestinale.

Après avoir ensemencé du bouillon glycériné avec un *B. coli* très virulent, j'ai abandonné les cultures pendant un mois dans l'étuve à 37°, et ensuite je les ai stérilisées à 120°.

Je choisis, ensuite, deux séries de cobayes auxquels j'injectai, par la voie de l'estomac pour la première série, et sous la peau pour la seconde, 4 c. c. du liquide susdit pendant cinq jours de suite. Au terme de cette période, quelques cobayes inoculés sous la peau moururent d'intoxication, en proie à un excessif amaigrissement; les autres, du même groupe, furent, peu après, inoculés dans le péritoine avec une dose mortelle de *B. coli* virulent, et ils survécurent.

Ils étaient donc bien vaccinés et, par conséquent, l'accoutumance intestinale chez les cobayes injectés par voie gastrique aurait dû également s'être déjà établie.

Or, les expériences démontrent précisément le contraire.

Tous ces cobayes, inoculés, même à petites doses, avec des cultures virulentes de bacilles typhiques, moururent, présentant le tableau abdominal classique de la fièvre typhoïde expérimentale (voir appendice n° 8).

Ce fait, en même temps qu'il démontre que le poison typhique

et le poison du *B. coli* ne possèdent pas la même fonction biologique, constitue donc, par ailleurs, entre les deux microbes, un caractère différentiel de grande valeur.

D'autre part, ce résultat est en parfaite harmonie avec ce qui doit se produire dans la nature, parce que, si le poison du *B. coli* était en état d'exercer, sur les parois intestinales et sur leur surface, les mêmes effets que nous avons reconnus au poison typhique, il resterait difficile de comprendre les lésions toxiques que l'on observe dans la muqueuse digestive dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale.

Après avoir démontré que la toxine du *B. typhique*, malgré l'apparente infériorité biologique de ce microbe, exerce sur les muqueuses une action beaucoup plus énergique que celle du *B. coli* et très différente de cette dernière, il est relativement facile d'en multiplier les caractères différentiels, en se basant sur les connaissances désormais acquises touchant la façon de se comporter de ces microbes et de leurs toxines dans l'organisme.

Une de ces connaissances a fait ressortir l'extrême facilité avec laquelle la toxine typhique, en vertu des lésions qu'elle détermine dans les muqueuses, provoque l'exaltation de la virulence et l'invasion successive de l'organisme, de la part du *B. coli* intestinal.

Il devenait donc intéressant de connaître aussi dans ce cas l'activité réciproque des deux toxines.

N'ayant pas encore réussi à préparer une toxine du *B. coli* aussi puissante que celle que j'étais parvenu à obtenir du *B. typhique*, je dus chercher une autre voie pour arriver au but que je m'étais proposé.

J'avais quelques vieilles cultures très toxiques de *B. typhique* et de *B. coli* en bouillon glycériné. En inoculant chaque jour 4 c. c. sous la peau de cobayes de 300-400 grammes, ces animaux mouraient régulièrement après la cinquième inoculation, c'est-à-dire après que chacun d'eux en avait reçu un total de 20 c. c.

D'autre part, j'avais observé, à plusieurs reprises, que l'injection de *B. coli* à l'intérieur de l'utérus ne déterminait aucun accident morbide chez les cobayes. Évidemment, la muqueuse

utérine normale forme une solide barrière contre le passage du *B. coli* virulent.

On sait, au contraire, avec quelle facilité le *B. coli* qui se trouve au contact des muqueuses, à l'état de virulence, peut émigrer à l'intérieur des organes, lorsque la constitution anatomique de ces muqueuses est altérée par l'effet des toxines microbiennes en général, et des toxines typhiques en particulier.

Par conséquent, en inoculant journellement, sous la peau des animaux, la même dose des cultures susdites de *B. typhique* ou de *B. coli*, douées du même coefficient toxique, la généralisation du *B. coli* pathogène, déjà présent dans l'utérus, aurait dû se produire plus ou moins rapidement, et tout retard à cette émigration du *B. coli* pouvait fixer exactement le degré d'action toxique sur la muqueuse utérine.

C'est pourquoi, après avoir choisi six cobayes intacts et à peu près du même poids, j'inoculai, dans la cavité utérine de chacun d'eux, 1 c. c. d'une culture en bouillon d'un *B. coli* très virulent.

Deux de ces cobayes servirent de témoins; en conséquence, ils furent inoculés quelques jours auparavant et laissés à part. Comme il était à prévoir, ils survécurent. L'un d'eux, sacrifié au bout de six jours, ne présenta aucune lésion interne appréciable; les cultures du péritoine restèrent stériles, et, des cultures de la cavité utérine, j'obtins seulement deux colonies de *B. coli* (voir appendice n° 9).

Sur deux autres cobayes, on commença le 29 août l'injection sous-cutanée journalière de 4 c. c. de cultures stérilisées de *B. coli*. Ils moururent tous deux le 4 septembre, c'est-à-dire au bout de 5 jours à peine, et après avoir reçu, en tout, 20 c. c. de liquide toxique. L'autopsie démontra la présence du *B. coli*, en quantité restreinte, dans la seule cavité utérine.

Enfin, le dernier couple de cobayes fut soumis le même soir (29 août) à l'injection sous-cutanée de 4 c. c. de cultures stérilisées du *B. typhique*. Le matin suivant (environ 12 heures après) ces deux cobayes étaient morts. Leur exsudat périctonéal était extraordinairement riche en *B. coli*; les cultures du sang du cœur et des autres viscères démontrent en outre la présence du même microbe. Évidemment ces animaux étaient morts d'infection générale du *B. coli*, provoquée par l'injection de 4 c. c. seulement de poison typhique.

La notable différence dans l'intensité des effets locaux de ces deux poisons, après ce que nous avons dit sur leur mode de préparation et sur la parfaite équivalence de leur pouvoir toxique général, nous dispense de tout commentaire ultérieur.

Elle s'ajoute à ce que nous venons d'apprendre sur leur valeur réciproque dans la détermination de l'accoutumance intestinale à la toxine typhique, pour mettre définitivement en relief les différences biologiques entre les deux microbes.

Donc, même à parité de coefficient toxique général, les toxines du bacille d'Eberth exercent sur les muqueuses une action incomparablement plus énergique et plus grave que les toxines du bacille d'Escherich.

Ces deux microbes doivent donc être considérés comme deux variétés distinctes, ne pouvant se substituer l'une à l'autre, dans la pathologie humaine et expérimentale.

VI

LE PROCESSUS BIOLOGIQUE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE HUMAINE EXPLIQUÉ D'APRÈS NOS DERNIÈRES CONNAISSANCES SUR LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE.

Les recherches que j'ai résumées dans ces trois mémoires sur la fièvre typhoïde expérimentale nous amènent à modifier notamment les notions actuelles touchant la fièvre typhoïde humaine.

La découverte du bacille d'Eberth, qui a renversé l'antique édifice étiologique de cette maladie, avait semblé tout d'abord tout expliquer d'une façon claire : le bacille typhique, se disait-on, pénètre dans le canal digestif, s'y multiplie avec rapidité, le couvre de ses lésions typiques, et y fabrique son poison qui doit infecter peu à peu l'organisme.

Des ulcérations intestinales, le microbe spécifique émigre peu à peu, souvent accompagné du *B. coli*, vers les autres organes lymphatiques internes : rate, glandes du mésentère, etc., et les complications de la fièvre typhoïde, les pharyngites, les bronchites, les processus catarrhaux de toutes les muqueuses, etc., sont des localisations du bacille d'Eberth ; on l'y a recherché, parfois trouvé ; presque toujours, cependant, on en a admis simplement la présence.

La fièvre apparut comme une conséquence directe des

troubles intestinaux, la diarrhée devint comme la *materia peccans* de la maladie, et la thérapie expérimenta contre elle les ressources de ses innombrables remèdes. L'épidémiologie, qui s'est prêtée aux faits à toutes les époques, s'est empressée de proclamer l'intangibilité des théories hydriques, comme elle avait soutenu l'influence des émanations putrides, de l'air du sous-sol, etc.

La fièvre typhoïde resta donc, ainsi que le choléra et la dysenterie, le type des maladies d'origine intestinale. Il ne faut pas s'étonner si, avec cette conception étiologique, le retour à la théorie *pythagénique* de Murchison, explicitement commencé par l'école de Lyon et brillamment soutenu par Malvoz, de Liège, n'a pas soulevé d'autres objections que celles qui sont basées sur quelques différences morphologiques ou biologiques entre le *B. coli* et le *B. typhique*.

Tout cela porte évidemment l'empreinte doctrinaire qui gêne si souvent dans la science le libre essor de la recherche expérimentale. Nous pouvons, aujourd'hui, nous faire d'autres idées sur cette question.

Tout d'abord, on doit abandonner la tradition qui considère la fièvre typhoïde comme une maladie d'origine intestinale : elle n'est autorisée ni par la clinique ni par la bactériologie.

Le plus souvent, en effet, les premiers symptômes de la fièvre typhoïde ne commencent pas du côté de l'intestin. Tandis que les malades marchent encore, ils se sentent fatigués, ont de légers vertiges, des bourdonnements d'oreille, des douleurs vagues, lancinantes, dans les membres ou dans le dos ; ils ont un sommeil agité et plein de rêves, perdent l'appétit et sont pris de céphalée ; la peau devient pâle et la physionomie exprime une grande lassitude, quelques malades seulement souffrent déjà de douleurs de ventre et de diarrhée¹, et le météorisme qui, avec la sensibilité douloureuse, devrait être le premier signe précurseur de la lésion intestinale, ne se produit pas toujours. Murchison² en a constaté l'absence dans 21 cas sur 100 : en général, ce symptôme ne se manifeste qu'après la première semaine. La douleur et la sensibilité abdominales sont des symptômes fréquents, mais non constants.

1. GRIESINGER, *Delle malattie da infezione*, Milan, 1864, p. 249.

2. MURCHISON, *Loc. cit.*, p. 126.

Il n'y a aucun rapport entre l'intensité de la diarrhée et l'extension des lésions intestinales constatées à l'autopsie.

Dans quelques cas, on observe d'abord une constipation qui ne se transforme en diarrhée qu'après l'administration d'un purgatif; parfois elle ne commence pas avant la troisième ou quatrième semaine de maladie; dans un grand nombre de cas elle est entièrement absente, et cependant, ces cas peuvent devenir mortels¹.

Lorsque la diarrhée commence, la rate est déjà grossie et la congestion bronchiale se révèle par des râles sibilants².

Quelques formes cliniques, appelées *spléno-typhoïdes*, sont caractérisées cliniquement par l'absence de désordres intestinaux, et anatomiquement par l'augmentation considérable du volume de la rate, et par des lésions intestinales peu développées ou même par l'absence de toute lésion³.

Dans un cas mortel, observé par Thue⁴, l'intestin ne présentait qu'une très légère tuméfaction des plaques de Peyer, sans ulcérations et sans hémorragies, bien que la rate et les reins continssent, à l'état de pureté, le bacille typique, Vincent⁵ et Banti⁶ parlent enfin de fièvres typhoïdes typiques *sans lésions intestinales*.

Telles sont, en résumé, les observations de la clinique et de l'anatomie pathologique. Quant à la présence des microbes spécifiques dans l'organe qui devrait être considéré comme leur siège le plus important, voici ce que nous connaissons.

Dans les fèces des typhiques, Gaffky⁷, Di Veste⁸, Pfuhl⁹, Eisenberg¹⁰, Rodet et Roux¹¹, Redtenbacher¹², etc., ne parvinrent jamais à démontrer, par les cultures, la présence du bacille

1. MURCHISON, *loc. cit.*, p. 428.

2. CHANTEMESSE, *Fièvre typhoïde (Traité de médecine de MM. Charcot, etc.)*, t. I, p. 752.

3. CHANTEMESSE, *Idem*, p. 774.

4. *Jahresbericht über die Fortschritte, etc.*, von Baumgarten, 1889, p. 496.

5. *Mercredi médical*, 1891, p. 46.

6. *Riforma medica*, oct. 1887.

7. *Mittheil. aus d. Kais Gesundheitsamte*. Vol. II, 1884.

8. *Il Morgagni*, 1883.

9. *Centralblatt f. Bakteriologie*, nov. 1888.

10. *Bakteriolog. Diagnostik*, 1886.

11. *Province médicale*, 1889.

12. *Zeitschr. f. Klin. Medicin.*, no 9, 1891.

d'Eberth; il fut trouvé quelquefois par Pfeiffer¹, Seitz², Merkel et Goldschmith³, Viltschour⁴; Karlinski⁵ ne l'isola jamais avant le second septenaire; Chantemesse⁶ dit qu'on commence à le rencontrer du dixième au vingtième jour....

Toutefois, ceux-là mêmes, qui ont déclaré avoir isolé, des fèces, le bacille typhique, se sont appuyés sur des caractères qui, aujourd'hui, ont perdu la valeur qu'on leur attribuait autrefois; plaques de gélose ou de gélatine lactosée au tournesol⁷, cultures sur pommes de terre, mobilité, etc.

Le seul moyen qui nous soit resté jusqu'ici pour différencier d'une manière assez certaine le bacille typhique du *B. coli*, c'est la culture en bouillon lactosé avec carbonate de chaux, imaginée par Perdrix, en 1891, postérieurement aux recherches de tous les auteurs cités plus haut, de sorte que leurs conclusions ne peuvent plus mériter confiance: c'est là pourtant tout ce que peut nous apprendre la bactériologie sur la présence des bacilles d'Eberth dans les déjections des typhiques.

C'est peu, et cela contraste avec le résultat des examens bactériologiques dans une maladie vraiment intestinale, le *choléra*, où nous parvenons le plus souvent à trouver, dans les déjections, les microbes spécifiques presque à l'état de culture pure!

Nous arrivons à la même conclusion en passant en revue les publications les plus récentes sur la recherche du bacille typhique dans les plaques de Peyer, dans les follicules lymphatiques intestinaux, etc. Dans ces cas, le plus souvent, on ne fit pas même de cultures, ou bien on les fit avec des méthodes insuffisantes: on s'est contenté des résultats des colorations microscopiques des coupes, sans se préoccuper de ce que le *B. coli* (qui se comporte à la coloration comme le bacille typhique) se

1. *Deutsche Medic. Wochenschrift*, 1883.

2. *Bacteriologische Studien sur Typhus-Aetiologie*, München, 1886.

3. *Centralblatt für Klinis. Medicin.*, 1887.

4. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1890, p. 279.

5. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1889.

6. Fièvre typhoïde (*Traité de médecine, etc.*), p. 732.

7. J'ai eu souvent l'occasion de faire, avec le contenu de l'intestin des animaux, des plaques couvertes de colonies de *B. coli*, qui se développaient sans rougir le substratum bleu, mais qui, par transports successifs en bouillon lactosé, finissaient par faire fermenter énergiquement le sucre de lait (voir 2^e mémoire). D'un autre côté, Silvestrini, lui aussi, dans un de ses mémoires (*Rivista gen. italiana di Clinica med.*, 1892) déclare que le rougissement de la gélose lactosée au tournesol peut être obtenu également en cultivant un bacille typique du typhus (page 27).

multiplie extraordinairement dans l'intestin durant la fièvre typhoïde, s'infiltre dans la sous-muqueuse, envahit les organes lymphatiques les plus proches, et finit par arriver presque toujours jusqu'à la rate!

A la rigueur, on pourrait soutenir que le vrai bacille typhi que n'a jamais été isolé, ni des déjections des typhiques, ni des altérations anatomiques de l'intestin. Je ne veux pas dire, toutefois, qu'il ne puisse un jour y être trouvé, mais il n'en reste pas moins ceci : si la fièvre typhoïde est une maladie qui a son origine et son point de départ dans le tube digestif, pourquoi n'y rencontre-t-on pas le microbe spécifique dès l'origine, avant les symptômes et les lésions de la maladie? Nous sommes donc amenés à croire que l'infection typhique n'a pas son siège dans l'intestin, et nous savons, par contre, que le bacille d'Eberth qui a pénétré dans l'organisme (peu importe par quelle voie), peut être entraîné par le courant sanguin ou lymphatique, ou bien par les leucocytes, dans la rate et dans les autres organes du système lymphatique, pour y commencer la période de pullulation et de lente intoxication générale qui caractérisent le type de la maladie. Nous avons étudié ce poison, et nous avons vu à quelles altérations, à quelles manifestations morbides il peut donner lieu dans l'organisme. Les principales sont localisées dans l'intestin, et ressemblent absolument aux lésions anatomiques du typhus abdominal.

Outre cela, nous avons vu que la muqueuse intestinale, à l'état normal, n'absorbe pas facilement le poison typhique; par conséquent, les premiers signes de l'intoxication typhique de l'homme, désignés sous le nom de *période d'intoxication, malaise prodromique*, etc., doivent être regardés non comme dus à l'absorption de la part de l'intestin, qui est tout à fait intact et ne contient pas de bactéries spécifiques, mais comme la conséquence du poison qui commence à être éliminé par les microbes déjà pullulants dans la rate et, peut-être, dans d'autres organes lymphatiques internes. Ces premiers phénomènes, caractérisés par la réaction fébrile (qui représente le signe le plus exact et le plus constant de l'intoxication durant l'entièrre période de la maladie), sont suivis de toutes les manifestations locales dont nous avons reconnu la cause. L'intestin reste frappé en première ligne; il s'y produit hyperhémies, congestions, infil-

trations lymphatiques interstitielles des parois, tuméfactions des follicules lymphatiques, nécrose de l'épithélium de revêtement, hémorragies, entérites, etc.

Cependant le *bacille coli* de l'intestin se multiplie excessivement, acquiert et exalte ses propriétés pathogènes et fermentatives; il se produit des gaz, et les parois intestinales, déjà frappées de paralysie toxique, se laissent distendre et deviennent douloureuses. Plus la maladie est de longue durée, plus sont graves les conséquences de l'intoxication sur les organes frappés.

C'est ainsi que, vers le dixième ou le douzième jour, une teinte jaunâtre superficielle annonce la mortification ou la nécrose toxique des follicules lymphatiques, suivie bientôt des ulcération caractéristiques sur l'origine desquelles on a tant discuté.

Mais nous avons vu que les effets de la toxine typhique ne se font pas sentir seulement sur la muqueuse intestinale; ils se manifestent, avec plus ou moins d'intensité, sur toutes les muqueuses de l'organisme.

La diffusion et l'activité de cette toxine sont si rapides et s'exercent à une telle distance qu'elles atteignent jusqu'aux organes des fœtus dans le sein maternel.

*Hastelius*¹ a observé, dans un fœtus de 8 mois, né d'une femme malade de fièvre typhoïde, la rate hyperhémique, les follicules de l'intestin et les ganglions lymphatiques du mésentère gravement infiltrés. Et cependant, aucun véhicule ne devait avoir rendu possible la colonisation du bacille d'Eberth dans le canal intestinal de ce fœtus! D'autre part, nous savons combien est difficile, pour les microbes, le passage du filtre placentaire.

On ne doit donc pas s'étonner si ce puissant poison exerce son action sur une autre muqueuse, très sensible, de l'organisme fébrifiant: la muqueuse respiratoire.

Ainsi, dans la fièvre typhoïde, les bronches et les alvéoles pulmonaires sont frappées de catarrhe avec congestion des vaisseaux et de la sous-muqueuse, ce qui rend l'organe entier susceptible de toutes les lésions inflammatoires, congestions,

1. Cité par EICHORST, *Pathologie interne*, t. IV, p. 384.

atélectasies, pneumonies hypostatiques et pneumonies fibrineuses, dues à la facilitation de l'invasion secondaire du pneumocoque ou d'autres microbes, parmi lesquels peut être aussi le bacille typhique.

On sait même que le catarrhe bronchial prend, dans la fièvre typhoïde, une certaine valeur diagnostique, spécialement dans les cas légers, où il s'agit d'établir la distinction entre la fièvre typhoïde et un simple catarrhe gastro-intestinal. En effet, les glandes bronchiales, elles aussi, présentent une infiltration égale à celle des glandes mésentériques¹.

Le larynx également est presque toujours attaqué ; il présente la mortification de la muqueuse, des congestions, des processus inflammatoires, des ulcérations, des escarres gangréneuses de l'épiglotte, des dégénérescences musculaires, des nécroses, etc.

Dès que les premiers phénomènes toxiques apparaissent, on voit également entrer en scène les lésions de la muqueuse de la bouche, de l'arrière-bouche et du pharynx ; c'est pourquoi on a : rougeur de la gorge, grossissement des amygdales et souvent angines catarrhales, sur lesquelles l'immigration d'autres germes établit de véritables processus croupaux et diphthéritiques, qui peuvent se propager par contagion.

Très probablement aussi, les néphrites, les épistaxis, les métrorrhagies, les cystites, les cholécystites, les endométrites, etc., qui accompagnent plus ou moins fréquemment les différents stades de la fièvre typhoïde, doivent être produites, ou du moins favorisées par l'action de la toxine typhique sur la muqueuse des organes respectifs.

On ne doit pas considérer autrement l'exanthème, sous forme de rougeole, qui se manifeste dans les cas les plus graves et qui, suivant Neuhauss, serait dû à des embolies capillaires de bacilles !

Ces bacilles n'ont jamais été trouvés ; mais, d'autre part, nous avons vu se produire exactement cette éruption chez le singe, à la suite de l'injection des seules toxines typhiques. Son origine toxique, du reste très facilement explicable, ne peut donc être mise en doute.

Dans la fièvre typhoïde humaine, nous assistons donc au

1. GRIESINGER, *loc. cit.*, p. 268.

développement lent et successif d'un procès toxique si varié et si protéiforme dans sa durée, dans son intensité et dans ses conséquences, qu'il a rendu possibles toutes les interprétations, les définitions et les classifications multipliées, dont a été l'objet la fièvre typhoïde.

Du reste, nous sommes maintenant en état de comprendre l'origine d'une symptomatologie si riche et si variée. Dans ce travail, nous avons parlé à plusieurs reprises de l'accoutumance de l'organisme au poison typhique; nous avons vu que cette accoutumance ne peut s'obtenir que dans des organes déterminés (intestin) et que, dans quelques cas, chez l'homme, elle doit être considérée comme tout à fait naturelle ou acquise sans l'intervention d'une intoxication typhique antécédente.

L'accoutumance intestinale des cobayes, obtenue au moyen de l'injection de poisons putrides, constitue l'exemple le plus démonstratif de cet important phénomène.

Après cela on ne devra plus s'étonner des multiples aspects d'un tableau morbide placé sous la dépendance de coefficients si disparates: quantité du poison produit par le bacille d'Eberth, sensibilité des divers organes qui doivent en subir l'action, manifestations toxiques et infectieuses de la part du *B. coli* intestinal, qui devient virulent, pathogène et tend à envahir l'organisme.

L'intestin n'est plus protégé par le revêtement épithéial; c'est pourquoi le libre passage des microbes et surtout l'absorption de leurs poisons ne trouvent aucune sorte d'obstacle.

La diarrhée typhique, provoquée par les lésions toxiques de la muqueuse, est certainement maintenue et aggravée par le *B. coli*.

L'extraordinaire multiplication de ce dernier et sa tendance à détruire tous les autres microbes et à rester le seul représentant des espèces bactériennes intestinales, sont le résultat d'un travail biologique actif, incessant et complexe, dont les dernières conséquences ne doivent certainement pas rester indifférentes pour l'organisme malade qui est contraint de les subir.

Lorsque la quantité du poison typhique a fini par atteindre la limite extrême de tolérance générale, indépendamment de la plus ou moins grande extension des lésions locales, la réaction

de l'organisme est vaincue, la fièvre cesse et la période du collapsus commence.

C'est précisément cette période de collapsus, c'est-à-dire la dernière phase de l'infection typhique, que nous reproduisons expérimentalement chez les animaux.

Chez eux, le virus typhique se généralise et manifeste ses effets trop rapidement pour pouvoir donner le temps à l'organisme de réagir par la fièvre dans les premières périodes de l'intoxication.

Si le bacille d'Eberth pouvait fabriquer sa toxine dans l'organisme humain avec la même intensité que les vibrios cholériques produisent la leur, la fièvre typhoïde serait, comme le choléra, une maladie courte et apyrétique.

Et ainsi tombe la dernière objection faite contre le bacille d'Eberth, et tirée de l'impossibilité où on est de reproduire avec lui, chez les animaux, le lent et caractéristique processus pyrétique qui est particulier à la race humaine.

APPENDICES

N° 4.

Expériences sur l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique, obtenue avec les injections gastriques de cultures typhiques stérilisées.

COBAYES	31	31	1	2	3	4	5 VII	Inoculation du virus dans le péritoine	RÉSULTAT
	VI	VII	VII	VII	VII	VII			
	Poids gr.:								
44	365	4	4	4	4	4	340	11 VII	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
45	290	4	4	4	4	4	270	14 VII	Meurt en 18 h. Absence de lésions intestinales.
46	340	4	4	4	4	4	340	—	Tué.
47	310	4	4	4	4	4	300	13 VII	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
48	390	4	4	4	4	4	375	15 VII	Meurt en 24 h. Viscères légèrement congestionnés.
49	410	4	4	4	4	4	405	9 VII	Meurt en 16 h. Absence de lésions intestinales.
50	385	4	4	4	4	4	370	20 VII	Meurt en 18 h. Viscères un peu congestionnés.
51	360	4	4	4	4	4	360	—	Tué.
52	420	4	4	4	4	4	420	1 VIII	A survécu.
53	400	4	4	4	4	4	385	17 VII	Meurt en 14 h. Absence de lésions intestinales.

COBAYES	31	31	1	2	3	4	5 VII	RÉSULTAT	Inoculation du virus dans le péritoine.	RÉSULTAT
	VI	VII	VII	VII	VII	VII				
	Poids gr.:									
54	270	4	4	4	4	4	205	Meurt le 7 VII	»	"
55	385	4	4	4	4	4	267	Meurt le 7 VII	»	"
56	350	4	4	4	4	4	250	A survécu	11 VIII	A survécu (vacciné).
57	325	4	4	4	4	4	230	Meurt le 9 VII	»	"
58	400	4	4	4	4	4	210	A survécu	22 VIII	A survécu (vacciné).
59	395	4	4	4	4	4	280	Meurt le 8 VII	»	"

N° 2.

Expériences sur l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique obtenue avec les injections sous-cutanées de poisons putrides.

COBAYES	15 VIII	INJECT. SOUS-CUTANÉES DE POISON PUTRIDE c. c.										1 IX	Inoculation du virus dans le péritoine.	RÉSULTAT	
		15	16	17	18	19	20	21	22	25	28				
Poids gr. :															
86	750	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	690	12 IX	Meurt en 14 h. Absence de lésions intestinales.
87	600	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	530	4 IX	Meurt en 24 h. Absence de lésions intestinales.
88	580	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	515	6 IX	Meurt en 16 h. Absence de lésions intestinales.
89	390	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	320	"	"
90	425	1	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	365	21 IX	Meurt en 20 h. Absence de lésions intestinales.
91	480	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	450	"	"
92	520	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	485	18 IX	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
93	430	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	390	9 IX	Meurt en 18 h. Absence de lésions intestinales.

N° 3.

Expériences qui démontrent que, chez les cobayes déjà vaccinés, peut subsister l'accoutumance de l'intestin au poison typhique, après qu'a été perdue l'immunité contre la fièvre typhoïde expérimentale.

I. Cobaye de 450 grammes. Déjà vacciné au mois de juin et qui a survécu à l'inoculation intraperitoneale d'un virus très actif. Le 15 août on lui inocule, dans le péritoine, 4 c. c. d'une culture typhique très virulente. Il meurt en 12 heures, d'infection générale, mais ne présente aucune lésion intestinale.

II. Cobaye de 390 grammes. Déjà vacciné au mois de juin, et qui a survécu comme plus haut. Le 29 septembre on lui inocule, dans le péritoine, 0,5 c. c. d'un exsudat péritonéal très virulent, en même temps qu'à un 2^e cobaye de contrôle, de 378 grammes. Ils meurent tous deux en 12 heures.

Chez le 1^{er} cobaye, il y a absence complète de réaction intestinale; chez le 2^e cobaye on a le tableau abdominal typique de la fièvre typhoïde expérimentale.

III. Cobaye de 425 grammes. Déjà vacciné au mois de juin et ayant survécu, comme ci-dessus. Le 5 septembre, on lui inocule, dans le péritoine, en même temps qu'à un 2^e cobaye de contrôle de 440 grammes, 0,5 c. c. d'une culture typhique très active.

Ils meurent tous deux en 14 heures. Chez le 1^{er} cobaye il n'y a pas de lésions abdominales; chez le 2^e, au contraire, elles apparaissent comme dans les infections typiques ordinaires.

N^o 4.

Virulence du bacille typhique dans le péritoine des cobayes vaccinés.

I. Cobaye vacciné, de 320 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 20 heures environ. On sacrifie le cobaye au bout de 48 heures, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qui, le jour suivant, est inoculée (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 350 grammes, lequel meurt en 18 heures.

II. Cobaye vacciné, de 293 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 24 heures. On sacrifie le cobaye au bout de 48 heures, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 280 grammes, lequel meurt en 16 heures.

III. Cobaye vacciné, de 410 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 24 heures environ. Le cobaye est sacrifié au bout de 3 jours et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qu'on inocule, le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf*, lequel meurt au bout de 10 heures.

IV. Cobaye vacciné, de 310 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. de la même culture que ci-dessus. On tue le cobaye au bout de 3 jours, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon, qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 330 grammes, lequel meurt en 12 heures.

V. Cobaye vacciné, de 360 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon, qui tue en 24 heures environ. Le cobaye est sacrifié au bout de 6 jours et, du péritoine, on tire une culture en bouillon, qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* qui meurt en 8 heures.

N^o 5.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique dans l'organisme des cobayes vaccinés contre la fièvre typhoïde expérimentale.

I. Cobaye vacciné n^o 1 (285 grammes). Il est inoculé sous la peau, avec 2,8 c. c. de toxines (10/0 du poids). Meurt au bout de 24 heures.

II. Cobaye vacciné n^o 1 (310 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 3 c. c. de toxines (10/0 du poids). Meurt au bout de 24 heures.

III. Cobaye vacciné n^o 1 (265 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n^o 2 (270 grammes), *de contrôle*; il est également inoculé sous la peau avec 4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye n^o 1 meurt au bout de 5 heures; le cobaye n^o 2, au bout de 8 heures.

IV. Cobaye vacciné n^o 1 (320 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 4,3 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n^o 2 (310 grammes) *de contrôle*; il est également inoculé, avec la même dose. Le cobaye n^o 1 meurt au bout de 8 heures; le cobaye n^o 2, au bout de 9 h. 30.

V. Cobaye vacciné n° 4 (350 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 5,2 c. c. (1,5 0/0 du poids) de toxines. Cobaye *neuf* n° 2 (385 grammes), *de contrôle*; il est inoculé avec 5,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye n° 1 meurt au bout de 9 heures; le cobaye n° 2 au bout de 12 heures.

VI. Cobaye vacciné n° 4 (223 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n° 2 (248 grammes), *de contrôle*; il est inoculé également avec 3,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids).

Le cobaye n° 1 et le cobaye n° 2 meurent en 7 heures environ.

VII. Cobaye vacciné n° 4 (450 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 6,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n° 2 (425 grammes), *de contrôle*; il est inoculé également 6,4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids).

Le cobaye n° 1 meurt au bout de 8 h. 30; le cobaye n° 2, au bout de 12 heures.

N° 6.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique (in vitro) dans le sérum des cobayes vaccinés.

I. Cobaye n° 1 (280 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,2 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 5 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye n° 2 (300 grammes), *de contrôle*; il est inoculé, sous la peau, avec 4,3 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye n° 1 meurt au bout de 8 heures, le cobaye n° 2, au bout de 9 heures.

II. Cobaye n° 1 (235 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 8 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye n° 2 (275 grammes), *de contrôle*; il est inoculé, sous la peau, 4 c. c. de toxine (1,5 0/0 du poids). Les 2 cobayes meurent en 12 heures.

III. Cobaye n° 1 (310 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,5 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 10 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye n° 2 (325 grammes), *de contrôle*; il est inoculé avec 4,8 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye n° 1 meurt au bout de 6 heures, le cobaye n° 2, au bout de 14 heures.

IV. Cobaye n° 1 (350 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,5 c. c. de toxines (1 0/0 du poids) mélées avec 8 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye n° 2 (390 grammes), *de contrôle*; il est inoculé avec 3,9 c. c. de toxines. On trouve les deux cobayes morts au bout de 24 heures.

V. Cobaye n° 1 (410 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4 c. c. de toxines (1 0/0 du poids) mélées avec 6 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye n° 2 (425 grammes), *de contrôle*; il est inoculé avec 4,2 c. c. de toxines (1 0/0 du poids). Le cobaye n° 1 meurt au bout de 36 heures, le cobaye n° 2, au bout de 24 heures.

VI. Souris n° 1 (17 grammes). Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines mélées avec 1 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (18^e, 5), *de contrôle*. Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

VII. Souris n° 1 (20 grammes). Est inoculée sous la peau, avec 1 c. c. de

toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes) *de contrôle*. Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout d'une heure, la souris n° 2 meurt en 12 heures.

VIII. Souris n° 1 (16gr,5). Est inoculée sous la peau, avec 0,8 c. c. de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (17 grammes), *de contrôle*; est inoculée avec 0,8 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 16 heures, la souris n° 2 au bout de 12 heures.

IX. Souris n° 1 (19 grammes). Est inoculée, sous la peau, avec 0^{rr},8 de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (19gr,5), *de contrôle*; est inoculée, sous la peau, avec 0,8 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent le jour suivant.

X. Souris n° 1 (18gr,5). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines mêlées avec 0,8 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (17 grammes), *de contrôle*; est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 24 heures, la souris n° 2, au bout de 16 heures.

XI. Souris n° 1 (20 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes), *de contrôle*; est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 survit, la souris n° 2 meurt au bout de 24 heures.

XII. Souris n° 1 (17gr,5). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0gr,2 de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes), *de contrôle*; est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent au bout de 24 heures.

XIII. Souris n° 1 (15 grammes). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (16gr,5), *de contrôle*; est inoculée dans le péritoine avec 0,1 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 survit, la souris n° 2 meurt au bout de 36 heures.

XIV. Souris n° 1 (22 grammes). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0,4 c. c. de toxines mêlées avec 3 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (20 grammes), *de contrôle*; est inoculée avec 0,4 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

XV. Souris n° 1 (16 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,3 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (16gr,5) *de contrôle*; est inoculée dans le péritoine, avec 0,3 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 3 heures, la souris n° 2 au bout de 2 h. 30.

XVI. Souris n° 1 (15 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines mêlées avec 1 c. c. de sérum de cobaye immunisé. Souris n° 2 (15 grammes), *de contrôle*; est inoculée, dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

XVII. Souris n° 1 (19 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,4 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné.

Souris n° 2 (17gr,5), *de contrôle*; elle est inoculée dans le péritoïne, avec 0,4 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 11 heures, la souris n° 2 au bout de 8 heures.

N° 7.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique (IN VITRO) dans le sérum de lapin hypervacciné.

I. Cobaye n° 1 (320 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,8 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 9,6 c. c. de sérum d'un lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (345 grammes), *de contrôle*; il est inoculé, sous la peau, avec 5,2 c. c. de toxines seules (1,5 0/0 du poids).

Le cobaye n° 1 meurt en 14 heures, le cobaye n° 2 en 9 heures.

II. Cobaye n° 1 (410 grammes); il est inoculé, sous la peau, avec 6,4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 12 c. c. de sérum de lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (420 grammes), *de contrôle*; il est inoculé, sous la peau, avec 6,2 c. c. de toxines seules.

Le cobaye n° 1 meurt en 8 heures, le cobaye n° 2 en 10 heures.

III. Cobaye n° 1 (400 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 6 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mélées avec 18 c. c. de sérum de lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (380 grammes), *de contrôle*; il est inoculé, avec 5,7 c. c. de toxines seules.

Le cobaye n° 1 meurt en 16 heures, le cobaye n° 2 en 9 heures.

N° 8.

Expériences comparatives, touchant l'action toxique sur les muqueuses, entre les toxines typhiques et les toxines du B. coli.

I. Cobaye n° 1 (295 grammes) et cobaye n° 2 (320 grammes).

(14 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. de culture en bouillon de *B. coli* virulent.

Les deux cobayes ont survécu. Le 20 août, on sacrifie le cobaye n° 2; à l'autopsie on ne rencontre aucune lésion appréciable; les cultures du péritoïne restent stériles; de la culture de la cavité utérine on obtient le développement de deux seules colonies de *B. coli*.

II. Cobaye n° 1 (335 grammes) et cobaye n° 2 (360 grammes).

(29 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. d'une culture en bouillon de *B. coli* virulent, et injection sous-cutanée consécutive de 4 c. c. de vieilles cultures stérilisées de *B. coli*. Cette injection est ensuite répétée pendant quatre autres jours, c'est-à-dire jusqu'au 4 septembre, où on trouva morts les deux cobayes.

Les cultures du péritoïne restèrent stériles; les cultures de la cavité utérine démontrèrent la présence de quelques colonies de *B. coli*.

III. Cobaye n° 1 (350 grammes) et cobaye n° 2 (430 grammes).

(29 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. de culture en bouillon de *B. coli* virulent et injection sous-cutanée consécutive de 4 c. c. de vieilles cultures typhiques stérilisées.

Le matin suivant, on trouve morts les deux cobayes.

A l'autopsie, on rencontre un abondant exsudat péritonéal très riche de *B. coli*; les cultures de la rate, du sang, du cœur et de la cavité utérine démontrent la présence du microbe en grande abondance.

N° 9.

Expériences pour obtenir l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique, au moyen des injections gastriques de cultures stérilisées du B. coli.

COBAYES	29 VIII	29	30	31	2 IX	3	4 IX	INOCULATION	RÉSULTAT	
									Poids gr.:	INJ. GASTRIQUE DE c. c.:
101	410	4	4	4	4	4	390	13 IX		Meurt en 10 h. Lésions intestinales graves.
102	400	4	4	4	4	4	375	16 IX		Meurt en 8 h. Lésions intestinales graves.
103	370	4	4	4	4	4	370	4 IX		Meurt en 16 h. Lésions intestinales graves.
104	355	4	4	4	4	4	320	8 IX		Meurt en 10 h. Lésions intestinales graves.
105	430	4	4	4	4	4	445	"		"
106	455	4	4	4	4	4	430	21 IX		Meurt en 12 h. Lésions intestinales graves.

COBAYES	29 VIII	29	30	31	2 IX	3	4 IX	RÉSULTAT	INOCULATION	RÉSULTAT	
										Poids gr.:	INJ. SOUS-CUTANÉES DE c. c.:
107	363	4	4	4	4	4	270	Meurt le 5.	—		"
108	380	4	4	4	4	4	295	—	13 IX	A survécu.	
109	405	4	4	4	4	4	320	—	9 IX	A survécu.	
110	450	4	4	4	4	4	365	—	21 IX	A survécu.	
111	390	4	4	4	4	4	—	Meurt le 4.	—	"	
112	375	4	4	4	4	4	310	Meurt le 8.	—	"	

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHARBON SYMPTOMATIQUE ET SES RELATIONS AVEC L'ŒDÈME MALIN

PAR LE DOCTEUR HERMANN DUENSCHIANN.

(Travail du Laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur.)

Le *bacterium Chauvai*, qui provoque la maladie du gros bétail connue sous le nom de charbon symptomatique (*Rauschbrand*), et le vibron septique de M. Pasteur, qui est la cause de l'œdème malin, sont des microbes contre lesquels il n'est pas difficile de vacciner les différentes espèces animales¹. Depuis que M. Behring a constaté les surprenantes qualités antitoxiques et préventives dont jouit le sérum des animaux vaccinés contre le tétanos et la diphtérie, on a commencé à examiner les propriétés du sérum des animaux immunisés contre d'autres maladies qui se prêtent à une étude expérimentale, telles que le choléra, la fièvre typhoïde, la pneumonie à diplocoques (Talamon-Fränel), le *hog-choléra*, etc. Il était donc très intéressant de faire la même étude pour le charbon bactérien et la septicémie.

On sait, depuis les travaux de MM. Roux et Chamberland, qu'il est facile de conférer l'immunité contre ces deux maladies, au moyen des substances solubles élaborées par les microbes qui les causent. En même temps, M. Roux a pu constater que les cobayes, vaccinés contre le charbon symptomatique, étaient immunisés aussi contre le vibron septique. M. Kitasato n'a pas pu vérifier ce point. C'est pourquoi nous avons voulu l'examiner à nouveau.

L'étude d'une maladie expérimentale devient surtout fructueuse, quand on peut séparer des corps microbiens les substances toxiques qu'ils élaborent. M. Roux a déjà montré comment on peut préparer la toxine du vibron septique.

1. Voici à ce sujet le travail classique de MM. ARLOING, CORNEVIN et THOMAS sur le Charbon symptomatique.

Cette toxine, injectée dans le péritoïne, tue rapidement le cobaye, à la dose de 40 c. c.; elle le fait mourir cachectique, à la dose de 20 c.c. dans un temps beaucoup plus long. Mais la toxine du charbon symptomatique, préparée de la même façon, ne tue plus le cobaye à cette dose. On comprend aisément que l'interprétation des causes de la mort soit malaisée, quand la dose mortelle est supérieure à 20 c. c.; en tout cas, l'expérimentation avec un tel liquide devient très difficile. Il entrat donc dans notre tâche de trouver un procédé pour préparer une toxine plus puissante et plus maniable. Nous avons pensé que, si nous y arrivions pour le charbon symptomatique, la chose serait encore plus facile pour le vibrion septique. C'est pourquoi nous avons commencé par le *bacterium Chauvæi*. Cela a encore un autre avantage. On sait que le lapin est ordinairement réfractaire au charbon symptomatique, bien qu'il y en ait toujours qui succombent à cette maladie. Nous n'avions donc qu'à renforcer l'immunité naturelle de ces animaux, en leur inoculant, à diverses reprises, le charbon symptomatique, et à essayer ensuite si leur sang manifestait des qualités préventives.

Il importait, tout d'abord, d'avoir des microbes aussi virulents que possible, afin de préparer une toxine très énergique et d'obtenir des sérum très actifs. Nous avons commencé par renforcer notre virus.

I

RENUFORCEMENT DU VIRUS DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Le virus avec lequel nous avons entrepris notre étude était précisément cette poudre vaccinante de M. Arloing, qui, délayée dans un peu d'eau et injectée dans la cuisse d'un cobaye, donne une tumeur non mortelle. A la suite de cette inoculation, l'animal est vacciné contre la maladie. On sait, d'après l'expérience classique de M. Arloing, qu'il suffit d'ajouter 0,5 c. c. d'une solution d'acide lactique au 1/5, à la dilution de la poudre vaccinante, pour qu'elle devienne sûrement mortelle.

Expérience. — Le 23 octobre, à 3 heures du soir, un gros cobaye mâle n° 38 (poids : 780 grammes) reçoit 0,5 c. c. du mélange mentionné dans les

muscles de la cuisse; l'animal meurt, avec tous les signes bien connus du charbon symptomatique, le lendemain à 5 heures, 26 heures après.

A l'autopsie nous constatons :

Dans la sérosité de la tumeur de la cuisse : des formes courtes du microbe (en bacille), avec de nombreuses spores en état de formation; ces dernières, tantôt au milieu du bacille (formes renflées), tantôt à l'extrémité du bacille (formes en battant de cloche). Très peu de liquide dans le péritoine, où nous trouvons les formes longues du microbe, en filaments qui traversent le champ d'observation, quelquefois d'un bout à l'autre. Dans le sang puisé dans le cœur, les bacilles sont très difficiles à trouver, mais ils n'y font jamais défaut.

Avec le sang de cet animal, resté 24 heures à 37°, nous avons inoculé un deuxième cobaye (sans acide lactique). Il en est mort en 18 heures. Avec le sang de celui-ci¹, nous avons pratiqué un troisième passage, et ainsi de suite un quatrième et un cinquième. On obtient ainsi un virus qui tue le cobaye, suivant les variations individuelles, au bout de 8 à 15 heures.

1. Pour puiser la semence, nous avons adopté le procédé pratiqué depuis longtemps à l'Institut Pasteur, avec des modifications insignifiantes. Nous croyons nécessaire de le décrire pour être complet :

1^o On peut prendre le suc musculaire dans la tumeur charbonneuse. Si l'on veut en obtenir des quantités un peu considérables, on doit enlever la peau aseptiquement et faire de larges incisions dans la tumeur (avec un couteau flambé) pour laisser sortir le suc cédémateur; on l'aspire dans les petits tubes effilés bien connus qui sont étranglés un peu au-dessus de l'effilure et stérilisés au four à flamber. Ce suc est très riche en microbes ;

2^o On peut aussi recueillir avec pureté de la sérosité péritonéale, à la condition de faire l'autopsie aussitôt après la mort, sans quoi, on pourra trouver dans cette sérosité des microbes étrangers qui ont traversé la paroi intestinale ;

3^o C'est dans le sang du cœur qu'il est le plus facile de puiser un virus pur avec les petites pipettes déjà décrites. Ce procédé nous paraît de beaucoup le meilleur ; avec lui il ne nous est jamais arrivé d'accident.

Les petites pipettes sont remplies jusqu'au niveau de l'étranglement. On les ferme en ce point au bec de gaz, en laissant le moins possible d'espace libre. On obtient ainsi un milieu suffisamment anaérobie pour que les microbes contenus dans le sang pullulent à la température de 37°. Il est facile de s'en rendre compte. Si, après un séjour de 24 heures à l'étuve, on casse la pointe du tube, il se produit toujours une petite projection, ce qui prouve qu'il y a eu dans le tube une formation de gaz, due au développement des microbes. De plus, le sang, qui était sans odeur auparavant, prend à l'étuve cette odeur caractéristique d'acide butyrique dont parle M. Kitasato, et il devient alors facile d'y trouver les microbes (à l'état de spores). Pour plus de sûreté nous avons toujours ensemençé une gouttelette du sang dans du bouillon exposé à l'air. Ce bouillon, à l'étuve à 37°, ne doit pas se troubler.

C'est ce sang resté 12-24 heures à l'étuve qui nous a servi à inoculer les animaux. Seulement, pour éviter les inégalités du dosage, il faut toujours très bien broyer le caillot avant d'y puiser; car le virus y est emprisonné. Mentionnons encore le fait que le sang enfermé dans les tubes clos garde sa pleine virulence pendant des mois.

II

REFORCEMENT DE L'IMMUNITÉ DES LAPINS

C'est avec ce virus renforcé que nous avons expérimenté sur les lapins pour obtenir un sérum préventif.

Comme nous étions en plein inconnu, on comprend aisément que nos tâtonnements, pour trouver le meilleur procédé, nous aient coûté un grand nombre d'animaux.

Il y a trois procédés d'inoculation : injection du virus dans la veine de l'oreille, dans le péritoine, ou enfin dans les muscles de la cuisse ; ce dernier mode d'inoculation est le plus dangereux. C'est pourquoi nous préférons inoculer la première fois dans le péritoine ou dans la veine de l'oreille. De cette façon on ne risque pas de voir succomber les lapins à la suite d'une tumeur charbonneuse, comme cela nous est arrivé une fois.

Nous avons ordinairement employé du sang charbonneux délayé dans 3-4 fois son volume d'eau stérilisée, et nous allons maintenant citer, à titre de renseignement, un cas typique de la marche de la maladie.

Expérience. — Le 12 janvier, le lapin n° 21 (poids : 1,950 grammes) reçoit 1,5 c. c. d'une dilution de sang au 1/4 dans le péritoine. Il commence à maigrir ; le 14 : 1,670 grammes ; le 16 : 1,530 grammes ; le 22 : 1,670 grammes ; le 26 : 1,630 grammes. Nous constatons de la diarrhée ; le 28 : 1,500 grammes ; le 29 : 1,390 grammes. Le 31 nous trouvons le lapin mort, avec une cachexie extrêmement prononcée.

Nous avons vu succomber de même des lapins après l'injection de 7 c. c. de cette dilution dans la veine de l'oreille, au bout de 25 jours ; avec 5 c. c. dans la veine, au bout de 17 jours ; avec 1 c. c. dans le péritoine au bout de 14 jours. Invariablement les lapins sont morts avec une diarrhée très forte.

On nous pardonnera d'avoir souvent été trop prompt à accuser la nourriture. La diarrhée est un des symptômes de la cachexie causée par la toxine qui se trouve toujours en quantité notable dans les tubes de sang charbonneux ainsi conservés à l'étuve. Ces lapins sont morts comme les cobayes auxquels, dans

nos expériences ultérieures, nous avons injecté la toxine que nous avons préparée.

Nos lapins mouraient d'autant plus sûrement que, pour les immuniser fortement, nous leur donnions des doses croissantes de virus, comme on le fait pour obtenir l'antitoxine diphtérique, par exemple. C'est un fait qui mérite d'être signalé que cette sensibilité à l'action du poison du charbon symptomatique chez un animal comme le lapin, qui est pour ainsi dire réfractaire au virus vivant.

Le procédé qui nous paraît aujourd'hui le meilleur pour obtenir un sang actif, c'est de commencer par l'injection de 0,5 c. c. d'une solution de sang charbonneux au 1/5, ou dans la veine ou dans le péritoine. Quand l'animal a repris son ancien poids, on peut répéter ces injections dans la veine ou le péritoine, ou bien se contenter d'une seule injection dans la substance musculaire de la cuisse. Il se forme alors un abcès dans cet endroit. Si on en recueille le pus avec des précautions aseptiques, et si on l'ensemence dans du bouillon ordinaire exposé à l'air, on n'obtient point de culture. Par contre, si, même trois semaines après l'inoculation, on aspire du pus dans des pipettes que l'on ferme à la lampe et qu'on mette celles-ci à l'étuve, il se fait dans leur intérieur une culture anaérobie de charbon symptomatique parfaitement légitime, virulente, riche en spores après quelques jours, dégageant des gaz et répandant l'odeur caractéristique.

C'est donc un fait analogue à celui observé par M. Metchnikoff, dans son étude sur le hog-choléra. Ce savant a montré que, dans les abcès qui se produisent chez les lapins vaccinés à la suite de l'inoculation d'épreuve, le microbe reste vivant et capable de tuer à petites doses les lapins neufs auxquels on l'inocule.

Nous avons vu ces abcès charbonneux persister jusqu'à 3 mois. Et il nous paraît évident que la présence de microbes virulents dans l'abcès équivaut à une injection continue de toxine, et contribue à augmenter les propriétés préventives du sang. D'un autre côté, l'injection de petites quantités de sang toxique, pendant la persistance des abcès, est extrêmement dangereuse. C'est un fait dont l'ignorance nous a coûté plusieurs animaux. En procédant ainsi, nous avons obtenu un sang actif avec 2 injections virulentes seulement.

Pour terminer, nous signalerons encore le fait curieux que des lapins en train de mourir cachectiques nous ont donné un sérum actif. C'est un fait qu'on a observé dans d'autres maladies, la diphtérie par exemple.

LISTE DES LAPINS VACCINÉS.

Lapin n° 8. — Le 12 novembre : 1,800 gr. : 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille. (Les solutions du virus sont toujours au 1/3 — 1/4). Le 21 novembre : 2,050 gr. : 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille; le 4 décembre 1,980 : 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille; le 26 décembre : 1,0 c. c. dans la cuisse; le 2 janvier, 1,900 grammes; le 8 : 1,980 grammes; le 9 : 2,040. *Saignée.* Le 12 : 3, c. c. dans la cuisse, 2,000 grammes; le 14 : 1,720 grammes; le 16 : 1,700 le 20 : 1,760. Le lapin meurt le 21 janvier.

Lapin n° 10. — Le 22 décembre : 2,400 gr. : 0,5 c. c. dans la cuisse. Tumeur très forte, nous le croyions perdu; le 2 janvier : 2,380; le 5, 2,360 : 1, c. c. dans la cuisse; le 8 : 2,270; le 14 : 2,370, 2 c. c. dans la cuisse; le 14 : 2,280; le 16 : 2,170; le 18 : 2,290; le 24 : 2,400. Dès lors il se porte toujours bien, tout en ayant dans la cuisse deux fistules suppurant qui ne se ferment qu'au commencement du mois de mars. C'est ce qui nous a empêché de le saigner. Le 15 mars, il est éprouvé avec 1/2 goutte de sang septique, ce qui ne lui a rien fait.

Lapin n° 11. — Le 22 décembre : 2,560 gr., 0,5 c. c. dans le péritoine; le 26 : 0,5 c. c. dans la cuisse. Le 2 janvier 2,750; le 5 : 2,640, 2, c. c. dans la cuisse; le 8 : 2,570; le 14 : 2,550; le 14 : 2,380; le 20 : 2,470; le 24 : 2,530. *Très forte saignée.* Le 28 : 2,300; le 30 : 2,480; le 1^{er} février : 1,890 grammes. *Il est saigné à blanc.*

Lapin 15. — Le 29 décembre 1,810 gr. 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille. Le 2 janvier : 1,600; le 8 : 1,530; le 14 : 1,350; le 15 : 1,200. Il est près de mourir. *Nous le saignons à mort.*

Lapin 16. — Le 2 janvier : 2,060 gr. 0,7 c. c. dans la veine de l'oreille ; le 5 : 1,880, le 5 : 1,880, le 8 : 1,830 ; le 14 : 1,890, 1 c. c. dans la cuisse ; le 14 : 1,600; le 18 : 1,730; le 22 : 1,800; le 26 : 1,750. *Nous prélevons un peu de sang;* le 29 : 1,610; le 30 : 1,800; le 1^{er} février : 1,740; le 3 : 1,570; le 4 : 1,460; *nous le saignons à blanc.*

Lapin 23. — Le 8 décembre : 1,940 gr. 0,3 c. c. dans le péritoine ; le 15 : 2, c. c. dans le péritoine ; le 22 : *saigné*; le 26 : 1, c. c. dans la cuisse. Le 2 janvier : 1,500; le 5 : 1,400; le 8 : 1,300; le 9 : 1,209. *Il est saigné à blanc.*

Lapin 31. — Le 8 décembre 1,910 gr. 0,2 c. c. dans la cuisse ; le 15 : 1,0 dans la cuisse, 1,800 grammes. Le 2 janvier : 1,600 grammes ; le 8 : 1,570 le 14 : 1,420 ; le 18 : 1,490 ; le 22 : 1,570 ; le 30 : 1,810 ; le 6 février 1,720. Il se rétablit complètement ; mais il a encore un abcès le 2 mars, que nous trouvons ouvert le 14 mars. Il est éprouvé avec une goutte de sang septique le 18 mars.

III

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES LAPINS IMMUNISÉS

Au début de nos expériences nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour mettre en évidence le pouvoir préventif du sérum des lapins immunisés. Tout d'abord, nous avons constaté que le sérum est quelquefois toxique pour les cobayes avant de devenir immunisant. C'est ainsi que deux cobayes (n° 49 et 76), ont succombé à la suite de l'injection de 10 c. c. du sérum des lapins 16 et 23; qu'un autre cobaye (n° 66) a péri après avoir reçu 5 c. c. du sérum du lapin n° 23. Dans ces trois expériences, la mort est survenue en vingt-quatre heures environ, sans qu'on puisse l'attribuer à une infection microbienne quelconque. Plus tard, le sérum de ces mêmes lapins s'est montré préventif, notamment celui du lapin 23 qui, à la dose de 10 c. c., ne cause plus aucun mal aux cobayes.

Une autre circonstance qui nous a empêché tout d'abord de reconnaître la propriété préventive du sérum, c'est que nous éprouvions les cobayes qui l'avaient reçu avec des doses beaucoup trop fortes de virus.

Dans ces conditions les animaux traités mouraient toujours, mais avec quelques heures ou quelques jours de retard sur les témoins.

Expérience. — Le 10 janvier, le cobaye n° 60 (de 645 grammes) reçoit 10 c. c. de sérum du lapin 23, (retiré seize jours après la dernière inoculation) dans le péritoine. Le 13 à midi : nouvelle dose de 5 c. c. du même sérum; et, six heures plus tard, 0,2 c. c. d'une solution du virus au 1/6. Témoin cobaye n° 64. Le lendemain matin, nous trouvons le témoin mort, tandis que notre animal se porte encore assez bien; mais nous apercevons déjà à la cuisse une petite tumeur, qui va en augmentant, et il meurt le 17 avec un charbon symptomatique typique.

Mais voici les résultats obtenus avec des doses moindres de virus d'épreuve.

Expérience. — Le 16 janvier, un cobaye mâle n° 68 (poids 500 grammes) reçoit 7 c. c. de sérum du lapin 15 dans le péritoine; un autre n° 71 (de 530 grammes), 10 c. c. de sérum du lapin 20 (non vacciné), également dans le péritoine. Le 19, à six heures du soir, tous les deux et le témoin n° 78 sont inoculés dans les muscles de la cuisse chacun avec 0,05 d'une solution du virus au 1/20. N° 78, le témoin, meurt le lendemain à midi (18 heures

après l'inoculation); n° 71 (avec le sérum non actif) meurt dans la nuit du 20 au 21 (à peu près 12 heures après le témoin); et le n° 68 n'a qu'une petite tumeur à peine sensible. Il se rétablit complètement au bout de quelques semaines (le 23 janvier : 410 gr.; le 7 février : 460; le 24 février : 490).

Nous avons alors répété l'expérience avec des doses moindres du même sérum.

Expérience. — Le 20 janvier, le cobaye 90 (de 550 grammes), reçoit 6 c.c. de sérum du lapin 15 dans le péritoine. Le cobaye 92 (de 610 grammes), 2 c.c. Le 23, à six heures du soir, ils reçoivent, en même temps que le témoin n° 91, 0,1 d'une solution au 1/20 du virus dans la cuisse. Le lendemain matin, nous trouvons le témoin mourant; n° 90 a une tumeur légère dans la cuisse pendant quelques jours; n° 92 presque rien du tout.

La préservation est encore possible, mais elle est moins complète, si on fait l'inoculation d'épreuve peu de temps après l'injection du sérum préservatif.

Expérience. — Le 19 janvier, à onze heures du matin, nous injectons 4,0 c. c. de sérum du lapin 15 au cobaye n° 77 (490 gr.). Le soir à six heures, il est éprouvé avec 0,05 c.c. du virus (solution au 1/20). Il en meurt le 20, à huit heures du soir (huit heures après le témoin n° 78).

Nous nous sommes alors servi d'un autre sérum, retiré du lapin 11, sérum que nous supposions plus fort.

Expérience. — Le 25 janvier, nous inoculons 1 c. c. de ce sérum au cobaye n° 99 (de 510 grammes); le 27, 2 c.c., moitié dans le péritoine, moitié sous la peau, et 0,1 c. c. d'une solution du virus au 1/20 dans la cuisse. Le 28, nous constatons déjà une tumeur commençante qui, le 29, s'est agrandie et a déterminé un tel gonflement que nous croyons l'animal perdu. Cependant le gonflement reste stationnaire quelques jours, un abcès se forme et s'ouvre le 7 février (440 grammes). Le 10, nous croyons l'animal si bien portant (460 grammes) que nous nous décidons à prélever du sang. L'animal commence alors à maigrir et il meurt cachectique le 18 février¹.

Il est encore plus difficile de préserver les animaux si on leur injecte en même temps, mais en des points différents du corps, le virus et le sérum.

Expérience. — Le 31 janvier, le cobaye n° 109 (de 560 grammes) reçoit 1 c.c. de sérum du lapin 8 dans le péritoine, 1 c.c. sous la peau; le cobaye

1. L'expérience suivante démontre l'importance du dosage du virus. Le 27 et le 29, nous répétons l'expérience que nous venons de raconter, avec la seule différence que nous inoculons 0,5 c.c. au lieu de 0,1 c.c. du virus. Le cobaye 100, sujet de cette expérience, meurt en 36 heures.

n° 110 (de 660 grammes), les mêmes doses du sérum du lapin 11. Simultanément ils sont éprouvés avec 0,05 c. c. du virus (solution au 1/20). N° 109 meurt le 2 février à midi; n° 110, dans la nuit suivante.

Expérience. — Le 1^{er} février, le cobaye 114 reçoit 2 c. c. de sérum du lapin 11 dans le péritoine, 1 c. c. sous la peau de la cuisse; 0,01 de la solution du virus au 1/20 (= 1/5 de la dose donnée à 109 et 110) dans la cuisse. Il en meurt le 3, à midi.

Décidément, nous avons mal réussi dans ces essais de préservation où le sérum de lapin est donné simultanément avec le virus. Ou le sérum est trop faible, ou les doses employées sont trop petites. Cependant, l'expérience suivante montre que tout réussit si on choisit le sang d'un autre espèce animale. On sait que plus une espèce est sensible à une maladie, plus elle donne ordinairement un sérum actif quand elle est immunisée. Puisque le cobaye est beaucoup plus sensible au charbon symptomatique que le lapin, nous avons encore fait une expérience avec le sérum du cobaye n° 55, qui est sûrement vacciné.

Expérience. — Le 9 février, nous en injectons au cobaye n° 130 (de 520 grammes) 2 c. c., dans le péritoine, 1 c. c. sous la peau; en même temps nous lui inoculons 0,05 c. c. d'une solution de sang au 1/20. Du 12 jusqu'au 15, nous trouvons, dans la cuisse infectée, un très fort gonflement qui ne commence à disparaître que vers le 18. Un mois après, le 9 mars, l'animal pèse 480 grammes.

Maintenant, nous allons parler de l'effet sur les animaux des mélanges de sérum préventif et de virus. Les résultats en sont beaucoup plus nets que ceux de l'inoculation séparée des deux substances. Nous attachions une grande importance à cette partie de nos recherches, parce que nous croyons que cette méthode pourrait être susceptible d'une application pratique dans beaucoup de cas.

Expérience : Le 16 janvier, nous ajoutons 0,05 c. c. de notre solution ordinaire du virus (au 1/20) à 1 c. c. de sérum du lapin 15, et nous injectons le mélange au cobaye 70 (de 550 grammes). A la suite il ne se produit qu'une légère diminution du poids. (Le 23 janvier, 460 grammes; le 7 février 540 grammes.)

C'était une expérience pour nous orienter. Nous l'avons répétée avec un témoin qui recevait, en même temps que le virus, du sérum de lapin non vacciné.

Expérience. — Le 17 janvier, la même dose du virus est ajoutée : 1^o à 1 c. c. de sérum du lapin n° 8 (vacciné); 2^o à 1 c. c. de sérum du lapin n° 20 (non vacciné). Le mélange 1 est injecté dans la cuisse du cobaye n° 72 pesant 600 grammes; le mélange 2 est injecté au cobaye n° 73 (de 670 grammes). Le cobaye n° 72 ne montre aucun changement, pas trace de tuméfaction (le 7 février, 660 grammes); le n° 73 meurt le 18 janvier, vingt heures après l'inoculation.

Cette expérience est répétée le 24 janvier, à 5 heures du soir, dans les conditions suivantes :

Expérience. — 1^o Le cobaye n° 96 (de 580 grammes) reçoit dans la cuisse 1 c. c. de sérum du lapin n° 8 mélangé avec 0,4 c. c. d'une solution au 1/10 de sang charbonneux. Les jours suivants : une petite tuméfaction à peine appréciable, c'est tout. Poids le 7 février : 570 grammes.

2^o Le cobaye n° 97 (490 grammes) : 1 c. c. de sérum du lapin 20 (non vacciné) avec la même dose du virus que le n° 96. Le matin du 26, nous le trouvons mort (environ 30 à 36 heures après l'inoculation).

3^o le témoin n° 93 : 0,4 du virus (même dose du virus, mais sans sérum) le fait mourir dans la nuit du 24 au 25.

Nous voyons donc clairement que le sérum d'un animal vacciné, mélangé à une dose mortelle du virus, empêche l'action de celui-ci; et chose curieuse, le sérum d'un animal non vacciné retarde un peu le développement de la maladie.

Nous avons donc un moyen très simple de savoir si un sérum est actif. C'est même un moyen qui permet d'en mesurer l'activité. On n'a qu'à chercher quelle est la dose du virus qui peut être neutralisée par 1 c. c. du sérum à examiner. Nous avons, par exemple, prélevé du sang du lapin 11 que nous croyions très fortement vacciné.

Expérience. — Le 27 janvier, 0,1 c. c. d'une solution de sang charbonneux au 1/4 est ajouté à 1 c. c. de ce sérum, le tout est injecté dans la cuisse du cobaye n° 98. A la suite, nous apercevons une tumeur sensible (le 29), mais l'animal se rétablit dans les semaines suivantes, tout en restant un peu maigre.

Nous répétons cette expérience avec un témoin qui reçoit un sérum non actif.

Expérience. — Le 30 janvier, à six heures et demie du s. 1 c. c. de sérum du lapin 11 avec 0,4 c. c. d'une solution au 1/4 de virus (= 1/2 goutte de sang) est injecté au cobaye n° 106 (640 grammes). Les jours suivants, une tumeur se développe dans la cuisse (poids le 7 février : 560 grammes); mais l'animal se rétablit.

1 c. c. de sérum du lapin 26 (non vacciné), mélangé avec la même dose du virus (que pour 106), est inoculé au cobaye 108 (de 680 grammes). Le lendemain matin, on le trouve mort.

Grâce à la dose énorme du virus, on ne voit plus d'effet ralentissant du sérum non actif. Mais nous n'avons pas encore atteint la limite de ce qu'on peut ajouter de virus à 1 c. c. de sérum du lapin 11 vacciné.

Expérience. — Le 1^{er} février, le cobaye 117 (de 780 grammes), reçoit le mélange de 1 c. c. de ce sérum et d'une goutte entière de sang charbonneux. Le 4 février : fort gonflement de la cuisse; le 7, le gonflement persiste; le 13, la tumeur diminue. Rétablissement.

Expérience. — Le 7 février, trois gouttes de sang sont ajoutées à 1 c. c. du même sérum; le tout est inoculé au cobaye 128. Une petite tumeur se forme, pas très prononcée, mais le cobaye maigrit de plus en plus, et le 17, nous le trouvons mort tout à fait cachectique. Le sérum a suffi pour préserver l'animal contre les effets du virus vivant, mais non contre ceux de la toxine.

Nous venons donc de constater que pour ce sérum, la limite est entre 1 et 3 gouttes. Pour des raisons dont nous parlerons tout à l'heure, nous ne croyions pas vaccinés les cobayes 68, 92, 96, 106. Par conséquent, nous nous en sommes servi pour définir cette limite pour le sérum du lapin 16.

Expérience. — Le 24 février, le cobaye n° 68 reçoit 1 c. c. de ce sérum avec 3 gouttes de sang charbonneux. Le matin du 27, nous le trouvons mort charbonneux.

Le cobaye n° 92 : 1 c. c. de ce sérum avec 2 gouttes de sang. Il en meurt, le 26 au matin.

Le 26 février, le cobaye n° 106 : 1 c. c. de ce sérum avec 2 gouttes de sang. Il en meurt cachectique, le 17 mars.

Le cobaye n° 96 : 1 c. c. de sérum avec 1 goutte de sang. Il a résisté. Le 26 février, 550 grammes; le 15 mars, 530 grammes.

On se rend aisément compte qu'avec un dosage soigneusement choisi, on peut avoir tous les degrés entre ces deux extrêmes : si on met trop peu de virus, l'animal n'éprouve rien du tout; si on en ajoute trop, il meurt ou bien charbonneux ou bien cachectique. On peut donc préciser un mélange par lequel on confère à l'animal une tumeur suivie de guérison. Et il était raisonnable de supposer qu'au moins ceux des animaux, qui avaient montré une tumeur non mortelle, seraient vaccinés.

Nous avions même espéré obtenir l'immunité sans tuméfaction prononcée. Mais voici ce que nous avons constaté.

Expérience. — Le 7 février, à onze heures m., le cobaye n° 70 est éprouvé avec 0,1 c. c. d'une solution du virus au 1/20. Il meurt le 8, à six heures du soir.

Le 24 février, le cobaye n° 72, éprouvé avec la même dose, meurt le 26.

Le 26, les cobayes n° 98 et n° 117 sont éprouvés avec 0,05, c. c. d'une solution au 1/20 du virus. Le matin du 28, nous les trouvons morts tous les deux.

Prévenu par ce fait, nous devions éprouver aussi ceux des cobayes qui avaient reçu le sérum séparément du virus : n°s 68, 90, 92 et qui n'avaient pas eu de tumeur appréciable. C'est pourquoi nous nous en sommes servi comme d'animaux neufs ; et en réalité, comme nous venons de le dire, nous les avons vu succomber ou résister comme s'ils avaient été neufs. Restait encore le cobaye 130 (puisque malheureusement nous avions perdu le cobaye n° 99 à la suite d'une trop forte saignée) ; il a été éprouvé le 7 mars : il a résisté.

Encore faut-il mentionner que tous nos essais, faits en vue d'arrêter la marche de la maladie avec notre sérum, si petite que fût la tumeur, ont été infructueux, soit que notre sérum ne fut pas assez actif, soit que le cobaye fut une espèce trop fragile pour cette étude.

Des expériences qui précèdent, nous conclurons :

1^o Que le sérum des lapins neufs n'a aucune action préventive, bien que ces animaux soient naturellement résistants au charbon symptomatique.

2^o Que les lapins qui résistent bien, d'ordinaire, à l'inoculation du *bacterium Chauvai*, sont cependant sensibles à l'action de la toxine de ce microbe.

3^o Que le sérum des lapins qui ont été inoculés, à diverses reprises, par le *bacterium Chauvai*, possède un pouvoir préventif quand il est injecté avant le virus.

4^o Que ce sérum, mélangé même à de fortes doses de virus, empêche l'action de celui-ci.

IV

PRÉPARATION DE LA TOXINE

Comme nous l'avons mentionné, M. Roux avait déjà préparé un produit soluble du vibron septique qui, à la dose de 40 c. c. tuait le cobaye en quelques heures, à la dose de 20 c. c. le faisait lentement mourir cachectique. Mais la substance, préparée de la même façon avec le *bacterium Chauvœi*, ne tuait plus le cobaye. Pour obtenir ces poisons, M. Roux enlevait toute la musculature à un cobaye qui venait de succomber à la maladie, il lui faisait subir l'action d'une petite presse, et il filtrait ensuite le suc exprimé sur une bougie Chamberland.

Convaincus que si les cultures faites jusqu'ici n'avaient pas donné de toxines bien actives, c'est parce qu'elles étaient faites dans des milieux trop pauvres, nous nous sommes mis à essayer des milieux de plus en plus riches en matières albuminoïdes. Une voie nous semblait tout indiquée par l'expérience de M. Roux, c'était de faire la culture dans le corps même d'un animal. Lorsqu'un cobaye succombe au charbon symptomatique, les microbes, que l'on trouve en abondance dans les muscles et dans la cavité péritonéale, n'ont point épuisé le milieu nutritif, et il suffirait peut-être de laisser la culture continuer, en mettant le cadavre à l'étuve, pour obtenir ensuite un suc musculaire plus riche en toxine. Malheureusement, dans ces conditions, les microbes de l'intestin envahissent bientôt le cadavre qui entre en putréfaction. Pour tourner cette difficulté, aussitôt après la mort du cobaye, en prenant toutes les précautions aseptiques, nous avons enlevé le tube intestinal compris entre deux ligatures, l'une placée sur le rectum au voisinage de l'anus et l'autre sur l'œsophage audessus de l'estomac. La cavité péritonéale était ensuite rincée à l'eau stérilisée et le cadavre placé à 37° sous une cloche stérilisée. Il est bien entendu que ce traitement ne met pas le corps du cobaye à l'abri de la putréfaction pour un temps très long, mais pour trente-six à quarante-huit heures au plus. Après ce temps, il ne répand aucune odeur de putréfaction, mais une odeur spéciale, caractéristique du développement du *bacterium Chauvœi*, odeur aigrelette et butyrique à la fois. Le suc musculaire, ensemencé dans du bouillon

au contact de l'air, ne donne pas de culture, ce qui prouve l'absence de microbes autres que les anaérobies.

En passant à la presse les muscles, découpés en morceaux, de ce cadavre où s'est fait une culture prolongée du charbon symptomatique, nous avons obtenu un suc musculaire que nous avons débarrassé des microbes par une filtration sur une bougie Chamberland. Nous dirons tout de suite que, dans toutes nos expériences sur la préparation de la toxine, nous avons stérilisé nos liquides par filtration et non par la chaleur, qui altère la substance active.

Le liquide, ainsi obtenu, tue un cobaye (n° 74, poids 550 grammes), en trente heures, à la dose de 15 c. c. injectés dans le péritoine. Un autre cobaye (n° 75, 620 grammes), qui en reçoit 10 c. c., est malade et se rétablit; éprouvé, six jours après, avec une dose mortelle, ordinaire, du virus, il a une tumeur charboneuse qui s'abcède et s'ouvre douze jours plus tard, mais il reste bien portant.

Cet essai nous ayant confirmé dans l'opinion qu'il suffit de faire la culture du charbon symptomatique dans des milieux riches en matières albuminoïdes pour avoir des toxines actives, nous avons tâché de réaliser ces conditions artificiellement et d'une manière plus simple.

Le *bacterium Chauvæi* étant anaérobie, les cultures doivent être faites à l'abri de l'air. Pour réaliser rigoureusement cette vie sans air, nous avons eu recours à la technique employée à l'Institut Pasteur et qui consiste à faire le vide dans les vases de culture au moyen d'une trompe à eau, puis à y laisser rentrer, à diverses reprises, de l'hydrogène pour enlever les dernières traces d'air. Au moyen d'un dispositif très simple, il est facile d'obtenir des cultures anaérobies dans des vases de grande capacité et avec une sécurité parfaite. Les vases de culture sont fermés au chalumeau, soit quand il sont vides, soit sous une pression d'hydrogène quelconque, mais inférieure à la pression atmosphérique. Notre microbe dégageant des gaz, nous fermons sur le vide. Lorsque le développement se fait bien, le dégagement gazeux est abondant, la pression développée est assez forte pour avoir amené une fois l'éclatement d'un de nos ballons. Cette augmentation de pression est un signe de réussite de la culture; quand elle n'existe pas, il ne s'est pas formé de toxine en quantité appréciable.

Les milieux nutritifs qui nous ont servi sont d'abord la macération de viande stérilisée au filtre Chamberland, puis le sérum de bœuf additionné de deux fois son volume d'eau distillée. Ce sérum ainsi étendu peut être chauffé à 115° à l'autoclave sans se coaguler, il louchit légèrement; il est donc facile à préparer et M. Roux l'avait employé autrefois pour cultiver le vibrion septique. Dans ce liquide albumineux, le *bacterium Chauvæi* détermine bientôt une coagulation; en même temps la réaction devient acide. Cette formation d'acide a déjà été signalée par M. Kitasato; pour l'éviter, nous avons ajouté du carbonate de chaux, mais alors le développement des microbes est arrêté. Dans ce sérum additionné d'eau, il ne se forme pas assez de toxine pour l'étude. La culture dans du sang fraîchement extrait du cœur nous a donné un filtrat qui, à la dose de 18 c. c., a tué le cobaye 63 en six semaines.

Nous avons mieux réussi en faisant nos cultures dans de la viande. Tout d'abord, pour imiter ce qui se passe quand on inocule un animal dans les muscles, nous avons essayé d'ensemencer les microbes au centre d'un épais morceau de viande fraîche, stérilisé à la surface et mis à l'étuve. Dans la profondeur du tissu les conditions de la vie anaérobie se trouvaient réalisées. Pour stériliser la surface du morceau de viande, nous avons eu recours au rôtissage superficiel à la flamme du gaz, à l'action de l'eau bouillante: mais tous ces procédés n'ont pas empêché des microbes d'impureté (notamment le *bacillus subtilis*) de se développer sur les morceaux de viande. Nous avons donc renoncé à ce procédé à cause de sa technique trop incertaine et nous nous sommes contenté de viande fraîche hachée, introduite dans des ballons à long col, à raison de 100 à 150 gr. par ballon de 400 c. c. environ, de façon à laisser les trois quarts du volume pour le développement des gaz. Dans chaque ballon, on ajoute 2 c. c. d'une solution de soude à 10 %, au moyen d'un entonnoir à longue douille, sans en mettre sur les parois du col. Les ballons ainsi préparés sont obturés par un tampon d'ouate, recouverts d'un cornet de papier, et stérilisés à 120° à l'autoclave pendant quinze à vingt minutes.

Après le refroidissement, on fait l'ensemencement en mettant une goutte de sang charbonneux dans chaque ballon, au moyen d'une longue pipette. Puis on enfonce l'ouate au moyen d'une

tige de verre flambée, assez avant dans le col, sur lequel on fait deux étranglements, entre lesquels se trouve la bourre de coton. Enfin, on fait le vide avec la trompe à eau, en laissant rentrer trois à quatre fois l'hydrogène dépourvu d'oxygène, et on ferme le ballon avec un petit chalumeau à main.

Après un séjour de 24 heures à la température de 37°, il y a déjà un changement visible produit par la culture. Toute la masse est devenue d'une couleur rouge brique (cette couleur disparaît immédiatement au contact de l'air). Cette coloration est un indice de la pureté de la culture. Celle-ci continuant à se développer, la viande qui s'était agglomérée à l'autoclave ne tarde pas à se désagréger, et, au bout de 10 jours, elle est convertie en un liquide avec un fort dépôt grumeleux. Ce liquide est extrêmement riche en microbes (qui se colorent bien d'après le procédé de Gram) et en spores (qui restent incolores). Une gouttelette ensemencée dans du bouillon ne doit pas donner de culture au contact de l'air. Les gaz, dégagés par les microbes, exercent une forte pression. Si on ramollit la pointe effilée du ballon dans un bec Bunsen, il se produit une soufflure et les gaz s'échappent et s'enflamme. Pour obtenir le plus possible de substance active, nous avons d'abord décanté la partie liquide. Le dépôt, recueilli dans un linge, fut soumis à la presse pour exprimer le liquide qu'il contenait. Le tout réuni est filtré d'abord sur du papier Chardin et enfin sur un filtre Chamberland.

A quel moment faut-il mettre un terme à la culture pour avoir le plus de toxine? Car il est très possible qu'après avoir élaboré leur poison, les microbes, continuant à vivre, le détruisent ou le transforment en partie.

Pour répondre à cette question, nous avons mis en train une série de cultures en ballons, que nous avons ouverts à différents intervalles. Le liquide d'un premier ballon, ouvert après 7 jours, a donné les résultats suivants :

10 c. c. ont tué le cobaye 103 (de 600 grammes), en 12 heures.

5 c. c. ont tué le cobaye 104 (de 580 grammes), en 30 heures.

3 c. c. ont rendu malade le cobaye 111 (de 780 grammes), qui a survécu.

4 c. c. ont fait mourir le cobaye 123 (de 450 grammes), en 10 jours.

5 c. c. ont tué le cobaye 115 (de 750 grammes), en moins de 15 heures.

La dose mortelle pour le cobaye est donc de 4 à 5 c. c.

Un deuxième ballon, ouvert après 9 jours, a fourni un liquide dont voici l'action :

5 c. c. injectés au cobaye 112 (de 820 grammes) l'ont rendu malade ; un mois après, 4 c. c. l'a tué au bout de 24 heures.

5 c. c. ont rendu le cobaye 116 (de 750 grammes) très malade, mais ne l'ont pas tué, l'épreuve a été faite le 1^{er} février ; le 26 et le 28, le même cobaye reçoit 1 c. c. et le 5 mars 0,5 c. c. ; il en meurt cachectique le 17 mars.

6 c. c. ont tué le cobaye 124 (de 340 grammes), en 48 heures.

Ce ballon a donc donné un produit moins actif que le premier.

Un troisième ballon fut ouvert le 11^e jour.

5 c. c. du liquide tuent le cobaye 124 (de 740 grammes), en 14 jours.

6 c. c. tuent le cobaye 125 (de 420 grammes), en 5 jours.

Ce ballon est également moins actif que le premier.

Pour le quatrième, âgé de 13 jours :

5 c. c. ont tué le cobaye 127 (de 340 grammes), en 5 jours.

Pour le cinquième, âgé de 15 jours :

5 c. c. n'ont pas tué le cobaye 1 de (de 600 grammes), mais l'ont rendu malade pendant 15 jours.

Ces résultats ne sont pas d'une régularité mathématique, ce qui n'est pas surprenant, puisque nous éprouvons la toxicité de nos cultures au moyen d'animaux de résistance variable, mais ils prouvent que, vers le septième jour, la culture a donné le maximum de toxine. D'ailleurs, en jugeant d'après l'aspect, il nous a semblé que, dès le dixième jour, la culture était arrêtée. Un autre essai, dans lequel les ballons ont été ouverts dès le deuxième jour, a montré que la toxicité maxima se rencontre dans les cultures âgées de 6 à 8 jours ¹.

1. Culture de 2 jours. — 5 c. c. de liquide filtré, injecté au cobaye n° 129, poids 327 grammes, sont sans effet.

Culture de 3 jours. — 5 c. c. ne tuent point un cobaye de 640 grammes, n° 131.

Culture de 4 jours. — 5 c. c. tuent le cobaye n° 132, poids 600 grammes, en 2½ heures.

Culture de 5 jours. — 5 c. c. provoquent un amaigrissement considérable chez le cobaye 134, mais ne le tuent pas. 5 c. c. tuent le cobaye 142, poids 620 grammes, en 30 heures.

Culture de 6 jours. — 5 c. c. tuent le cobaye, n° 140, du poids considérable de 830 grammes, en 20 heures.

Mentionnons encore qu'un ballon témoin non ensemencé, traité de la même façon, nous a donné un liquide tout à fait inoffensif, à la dose de 10 c. c. pour un cobaye de 450 grammes (n° 120). Cet animal, éprouvé 4 jours après avec 0,1 c. c. du virus (au 1/20), est mort du charbon symptomatique en 15 heures.

Lorsqu'on ne dispose pas d'une trompe à eau ou d'une pompe pour faire le vide, on peut procéder comme il suit :

Un flacon (d'un litre) est rempli d'un kilogramme de purée de viande, additionnée de 15 c. c. d'une solution de soude à 10/0, et fermé avec un bouchon de caoutchouc à deux trous qui laissent passer deux tubes de verre ; l'un, qui descend jusqu'au fond du vase, est courbé en dehors à angle droit, et porte dans sa partie horizontale deux étranglements entre lesquels se trouve une bourse d'ouate. L'autre, qui est destiné à laisser échapper les gaz, s'arrête dans le col du flacon et est obturé, extérieurement, par un petit bouchon de coton protégé par un cornet de papier. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 120° ; quand la température s'est abaissée à 100° et qu'il n'y a donc pas trace d'air dans la viande, on enlève le flacon ; on le met, aussi rapidement que possible, en communication avec l'appareil à courant d'hydrogène, pour empêcher la dissolution de l'air dans la masse de la viande, et on laisse passer l'hydrogène jusqu'au complet refroidissement. On ensemence alors avec une petite pipette par le petit tube droit, tout en laissant aller le courant d'hydrogène. Après cela, on enfonce le bouchon d'ouate et l'on ferme le petit tube de dégagement avec un bouchon de caoutchouc. L'autre tubulure est fermée au chalumeau, au point de l'étranglement. Ceci fait, le flacon est mis à l'étuve. Quand les gaz commencent à se dégager, on retire le bouchon de caoutchouc, et la culture reste anaérobie, grâce à cette production gazeuse. Il nous semble que ce procédé est moins rigoureux que le précédent, car les cultures ainsi faites n'étaient pas aussi abondantes que dans les ballons. Mais il suffit cependant à produire une toxine suffisamment active pour l'étude.

Un liquide qui tue à la dose de 5 c. c. n'est pas encore bien maniable pour des expériences sur les animaux. Il fallait donc le condenser. Puisqu'il est impossible d'avoir recours à la chaleur, nous n'avons à notre disposition que la condensation

dans le vide sur l'acide sulfurique. L'opération est faite à la température de 32°, de sorte qu'en 60 heures, 210 grammes de liquide sont réduits à 65 grammes, c'est-à-dire au tiers environ. Ce liquide concentré laisse déposer des cristaux qui augmentent beaucoup, si on a soin de le laisser au froid pendant 24 heures, au sortir de l'exsiccateur. Ces cristaux sont formés par du phosphate ammoniaco-magnésien, et il est facile de les séparer par filtration sur papier épais. Il va sans dire que toutes les manipulations sont faites avec pureté, que les vases, les filtres employés sont stérilisés; avec ces précautions, on réussit à obtenir une toxine concentrée qui se conserve sans altération.

C'est une substance évidemment très complexe, qui se présente sous l'aspect d'un liquide clair, de couleur brun foncé (à peu près semblable à la tuberculine) et qui répand une odeur prononcée d'acide butyrique. La réaction est légèrement acide.

Ce liquide nous a servi aux expériences suivantes :

Expérience. — Le 18 février, 1,5 c. c. a tué le cobaye 145 (de 440 gr.), en 5 jours.

Le 18 février : 1,0 c. c. a rendu malade le cobaye 147 (de 450 gr.), pour trois semaines. Le 19 mars, il était encore très maigre.

Le 18 : 0,5 c. c. n'a donné qu'un malaise passager au cobaye 146 (de 700 gr.). Trois jours après, ce cobaye, bien portant en apparence, fut éprouvé avec 0,1 c. c. du virus au 1/20. Il mourut 30 heures après.

Le 20 février, 2,5 c. c. sont injectés au cobaye 153 (de 570 gr.). Il en meurt en 22 heures.

Le 21 février, 2,0 c. c. ont donné la mort au cobaye 156 (de 500 gr.), en 21 heures.

Nous pouvons donc regarder comme établi : 1^o que la dose de 1,5 c. c. est mortelle; 2^o que la dose de 2 c. c. tue rapidement le cobaye. Ces données nous ont servi de base pour les expériences ultérieures.

V

ACTION DU SÉRUM DES ANIMAUX IMMUNISÉS SUR LA TOXINE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Maintenant que nous sommes munis d'une toxine active à petite dose, il est facile de savoir si le sérum des lapins immunisés, qui est doué d'un pouvoir préventif, a aussi une propriété

antitoxique. Pour cela, il suffit de mélanger *in vitro* le sérum avec une dose mortelle de toxine et d'injecter le mélange dans le péritoine de cobayes.

Expérience. — Le 21 février, le cobaye n° 457, du poids de 550 grammes, reçoit dans le péritoine 2,5 c. c. de toxine concentrée, mélangée à 2,5 c. c. de sérum du lapin immunisé n° 16. Ce cobaye résiste, tandis que le cobaye témoin 456, du poids de 500 gr., meurt en 24 heures, après avoir reçu 2,0 c. c. de la même toxine.

Expérience. — Le 23 février, nous injectons dans le péritoine d'un cobaye 461, poids 470 grammes, 3 c. c. de toxine (dose deux fois mortelle) mélangés à 2 c. c. de sérum du lapin 16. Ce cobaye résiste.

Le 24 février, le cobaye 462 reçoit de même, dans le péritoine, 3 c. c. de toxine et 1,5 c. c. seulement de sérum du lapin 11. Il résiste également.

Pour bien montrer que le sérum des lapins immunisés n'agit pas en diluant la toxine, nous avons fait la contre-épreuve avec du sérum de lapin non vacciné.

Expérience. — Le 24 février, le cobaye n° 463, poids 670 grammes. reçoit le mélange de 3 c. c. de toxine et de 2 c. c. de sérum du lapin 11, vacciné. Il résiste, tandis que le cobaye 464, du poids de 670 grammes, meurt en moins de 15 heures, après avoir reçu seulement 2,5 c. c. de toxine mélangés à 2,5 c. c. de sérum d'un lapin neuf.

On peut, d'ailleurs, augmenter encore la dose de toxine par rapport à celle du sérum, et constater encore un effet antitoxique. C'est ainsi qu'un cobaye, auquel on injecte un mélange de 4 c. c. de toxine et de 1 c. c. de sérum du lapin 16, maigrit, mais ne meurt que 8 jours plus tard en état de cachexie.

Le sérum antitoxique manifeste-t-il encore ses effets lorsqu'on l'injecte, non plus mélangé à la toxine, mais dans un point du corps éloigné de celui où on introduit le poison?

Et d'abord, la quantité de toxine qui tue, lorsqu'elle est introduite dans le péritoine, est-elle encore mortelle lorsqu'on l'injecte sous la peau?

Expérience. — Le 23 février, le cobaye n° 460, du poids de 550 grammes, reçoit sous la peau du ventre 2 c. c. de toxine. Après quelques heures, un œdème de 4 centimètres de long sur 2 de large se développe au point d'injection; de la sérosité sort par le trajet de l'aiguille; la peau est macérée, puis se nécrose les jours suivants, mais l'animal ne meurt pas.

L'action nécrosante de la toxine du charbon symptomatique, lorsqu'elle est introduite sous la peau, est donc très énergique

et est comparable à celle qu'exercent d'autres poisons microbiens, le poison diptérique, par exemple. Si, dans l'expérience précédente, l'animal n'a pas succombé, c'est que la majeure partie de la toxine injectée n'a pas été absorbée à cause de la rapidité et de la violence du processus local. Il n'en est plus de même, si on fait l'injection en plusieurs piqûres et à divers endroits du corps.

Expérience. — Le 24 février, 2 c. c. de toxine sont injectés à un cobaye de 450 grammes (n° 166), en quatre piqûres, par portions de 0,5 c. c. Deux sont faites dans les muscles des cuisses, deux sous la peau du ventre, à distance l'une de l'autre. Le 25 au matin, l'animal est trouvé mort.

L'injection préalable du sérum de lapin immunisé préserve les animaux contre les effets de la toxine injectée sous la peau.

Expérience. — Le 23 février, le cobaye n° 163, du poids de 580 grammes, reçoit 2,5 c. c. de toxine sous la peau, en quatre piqûres éloignées les unes des autres. Une heure auparavant, on lui avait injecté dans le péritoïne 2 c. c. du sérum du lapin immunisé n° 41. Ce cobaye a résisté.

Un cobaye témoin n° 41, de 540 grammes, reçoit d'abord dans la cavité abdominale 2,5 c. c. de sérum d'un lapin non immunisé, puis une heure après, 2,0 c. c. de toxine sous la peau en quatre piqûres; il meurt le 27 février.

Tous ces animaux, traités avec le sérum et qui ont survécu, ont été plus ou moins malades. Le mélange de sérum et de toxine est loin d'être inoffensif, aussi ne croyons-nous point que le sérum et la toxine agissent l'un sur l'autre en se neutralisant mutuellement. Tout ce que l'on peut dire, c'est que le sérum, injecté à un animal, suspend ou amoindrit les effets délétères de la toxine, comme si le sérum avait sur l'organisme de l'animal ou du moins sur une partie de ses cellules une action opposée à celle de la toxine.

Dans le liquide parfaitement limpide que nous avons appelé toxine, il y a, cela nous paraît évident, outre la substance nocive spécifique, encore quantité d'autres substances solubles qui, tout en étant toxiques elles-mêmes, n'ont rien à faire avec le corps dont les effets délétères sur l'organisme sont suspendus par le sérum. Il doit notamment y avoir une grande quantité de sels provenant de la viande décomposée, et desquels il faut tâcher de se débarrasser.

Il serait très utile d'isoler le poison du charbon symptomatique.

tique de toutes ces impuretés qui l'accompagnent. Pour des raisons purement extérieures au sujet, nous n'avons pas pu pousser plus loin cette partie de notre étude. Cependant, les quelques expériences que nous avons faites, pour nous orienter dans cette voie, ne laissent pas de présenter quelque intérêt.

Le premier procédé de purification que nous ayons essayé, c'est la précipitation par une grande quantité d'alcool. 25 c. c. d'une substance, qui tue le cobaye à la dose de 3 c. c., ont été précipités par 250 à 300 c. c. d'alcool à 96°. Nous avons laissé déposer le précipité, puis décanté l'alcool. Le précipité fut complètement desséché dans le vide, puis dissous dans 16 c. c. d'eau distillée stérilisée et filtré sur un filtre stérilisé; 2 c. c. de ce liquide ont donné la mort au cobaye 175 (de 850 grammes en 5 jours. Ce liquide est donc à peu près aussi toxique que la substance originelle. Pour examiner la portion dissoute dans l'alcool, nous avons évaporé celui-ci dans le vide; et le résidu fut dissous dans 12 c. c. d'eau et filtré. 2,5 c. c. ont tué le cobaye 182 (de 570 grammes) en 1/2 heure, par injection intraperitoneale; il est mort comme foudroyé. Une dernière portion de 20 c. c. de toxine, dont 3 c. c. ont tué le cobaye 174 (de 550 grammes) en 30 heures, fut traité par la *dialyse* pendant une nuit. Ce qui restait dans le dialyseur fut évaporé dans le vide. La substance sèche fut dissoute dans 6 c. c. d'eau stérilisée. *Cette solution filtrée* a tué le cobaye 183 (de 480 grammes) en moins de 15 heures, à la dose de 2 c. c.

La substance soluble dans l'alcool et celle qui y est insoluble sont toutes deux toxiques. Si nous avions eu le loisir de les préparer en plus grande quantité, nous aurions essayé sur chacune d'elles l'action du sérum préventif et du sérum de lapin non immunisé. Il nous paraît peu probable que le sérum actif contrebalance en même temps les deux substances que nous avons séparées. C'est là un point intéressant dont nous reprendrons l'étude.

VI

ACTION DE LA TOXINE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE SUR LES COBAYES

Quelle est la nature de cette toxine du charbon symptomatique qui, suivant la dose, tue un cobaye en 2 heures, 3 jours, 10 jours, un mois et même davantage? Nous ne sommes pas assez avancés

pour répondre à cette question. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que, lorsqu'on l'injecte à dose mortelle dans le péritoine d'un cobaye, celui-ci présente bien des symptômes que l'on observe chez un animal inoculé avec le *bacterium Chauvæi*. Il cesse de manger, est triste, a les poils hérissés; vacille sur ses jambes, est agité de brusques mouvements convulsifs, surtout quand on le touche, et présente une hypothermie qui va croissant jusqu'à la mort. A l'autopsie, on trouve un peu de liquide dans la péritoine; point de microbes, ni dans les sérosités, ni dans le sang, ni dans les organes. On ne remarque aucune lésion apparente du foie, de la rate ou du rein. L'aspect des organes ne présente non plus rien de caractérisé à l'œil nu, lorsque la mort survient au bout d'un mois, à la suite de la cachexie. Comme l'amaigrissement est extrême, ils paraissent simplement réduits de volume. Y a-t-il une action sur le système nerveux? Sur quelles parties du corps agit le poison pour amener ainsi une consomption fatale, comme on en observe chez les animaux inoculés par certains virus? Sans pouvoir répondre à toutes ces questions, nous dirons que les cellules, qui constituent les moyens ordinaires de défense de l'organisme, nous semblent atteintes. En effet, tous les animaux qui ont reçu des doses de toxine un peu inférieures à la dose mortelle, restent pendant assez longtemps particulièrement sensibles au virus vivant du charbon symptomatique. Pendant les jours qui suivent immédiatement l'administration du poison, leur sensibilité à l'inoculation est exagérée, ainsi que cela a été déjà observé par M. Roger. C'est ce qui nous fait dire que la toxine a paralysé ou affaibli les phagocytes.

Nous supposons, avec M. Roger, que cet effet prédisposant immédiat de la toxine ferait place à un état vaccinal consécutif. Après avoir attendu que les animaux aient recouvré leur ancien poids, nous les avons éprouvés avec du virus vivant, à des temps variables après l'injection de la toxine.

Voici les résultats que nous avons obtenus, l'inoculation d'épreuve étant toujours faite avec 0,1 c. c. de sang charbonneux dilué au 1/20.

Expérience. — Le 18 février, le cobaye n° 146 reçoit 0,5 c. c. de toxine (1/3 de la dose mortelle). Éprouvé le 21 (=3 jours après). Meurt en 34 heures.

Le 31 janvier, le cobaye 111 reçoit 3 c. c. (4 c. c. en ont tué en 10 jours). Éprouvé le 7 février (= 7 jours après). Meurt en 18 heures.

Le 14 janvier, le cobaye n° 65 reçoit 5 c. c. (12 c. c. ont tué rapidement). Éprouvé le 23 (= 9 jours plus tard). Le matin du 25, trouvé mort.

Le 7 janvier, le cobaye n° 59 : 12 c. c. d'une toxine (dont 18 c. c. ont tué en 3 semaines). Eprouvé le 19 (= 12 jours après). Meurt 36 heures après.

Le 8 février, le cobaye n° 1 : 5 c. c. de toxine (dont la dose mortelle est entre 6-7 c. c.). Éprouvé le 6 mars. Le 8 au matin, trouvé mort.

Nous avons essayé aussi de toutes petites doses répétées.

Expérience. — Le 12 février, le cobaye 134 (600 grammes) reçoit 5 c. c. de toxine (la même dose avait tué n° 127 en 5 jours). Il se rétablit en 3 semaines. Alors il reçoit de la même toxine : le 1^{er} mars, 1 c. c.; le 3, 0,5 c. c.; le 4, 1 c. c.; le 5, 0,5 c. c. Pendant ce temps le poids monte de 550 grammes à 580 grammes. Le 7 au soir, il est éprouvé. Il meurt le 8, en 30 heures.

Expérience. — Le 10 février, le cobaye 131 (de 640 grammes) reçoit 5 c. c. de toxine (dose mortelle entre 6-7 c. c.). Il maigrit, se reprend lentement, et paraît bien portant le 28. Il reçoit alors : le 28 février, le 3 mars, le 5, le 12 : 0,5 c. c. de la même toxine. Éprouvé le 15 mars, il succombe 36 heures après.

Ces résultats absolument négatifs nous ont véritablement surpris, surtout ceux des deux dernières expériences. Peut-être que des animaux, éprouvés beaucoup plus longtemps après l'administration de la toxine, auraient résisté. Peut-être que pour vacciner, il faudrait donner des doses inférieures au 1/10 de la dose mortelle? Tout ce que nous pouvons dire, c'est que la toxine, tirée des milieux artificiels et non altérée, nous semble un mauvais moyen de vaccination. Non seulement les animaux ainsi traités ne sont pas réfractaires au virus vivant, ils sont encore plus sensibles à l'action de la toxine elle-même.

Expérience. — Le 1^{er} février, le cobaye 116 reçoit 5 c. c. de toxine (dont 6 c. c. ont tué en 2 jours). Il maigrit. Le 26 février, apparemment bien portant, il reçoit 1 c. c. de toxine (de la même toxicité); le 28, même injection; le 5 mars : 0,5 c. c. Il commence à maigrir de nouveau et meurt le 17, tout à fait cachectique.

Le 31 janvier, le cobaye 112 : 3 c. c. de la même toxine que le cobaye précédent. Il perd plus d'un quart du poids dans les trois semaines suivantes. Il semble se rétablir un peu; reçoit le 26 février, 1 c. c. de la même toxine qui le fait mourir en 36 heures.

Ces animaux périssent avec des doses de toxine tout à fait inoffensives pour des animaux neufs, ce qui doit être rapproché du fait que les animaux traités de même avec la toxine n'étaient

pas vaccinés contre le virus vivant. Cette substance semble donc déterminer des lésions dont l'organisme se débarrasse difficilement et contre lesquelles il paraît mal armé.

VII

VACCINATION DES ANIMAUX CONTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

Nous avons, par une autre voie, obtenu des résultats positifs qui confirment ceux déjà publiés par M. Roux. Ce savant a d'abord vacciné avec des cultures stérilisées à 115°, procédé dont nous ne nous occuperons pas ici, car il fait usage d'une substance qui a subi de fortes altérations par la chaleur. Ce procédé est analogue à ceux qu'on emploie pour donner l'immunité contre la diphtérie et le tétanos au moyen de toxine chauffée. Ce qui nous intéresse ici, ce sont les expériences dans lesquelles M. Roux a conféré l'immunité avec la sérosité filtrée d'un cobaye ayant succombé au charbon symptomatique¹. Comme nous l'avons décrit plus haut, nous avons renforcé la toxicité de cette sérosité, en laissant pendant quelque temps le cadavre du cobaye à l'étuve. Le liquide, filtré sur le filtre Chamberland, a tué à la dose de 18 c. c. Avec ce liquide, nous avons fait les expériences suivantes :

Expérience. — Le 17 janvier, le cobaye 75 (de 650 grammes) reçoit 10 c. c. dans le péritoine. Il devient malade, mais se rétablit bien vite. Nous l'éprouvons le 23. Le gonflement consécutif à l'inoculation aboutit à un abcès qui s'est ouvert 12 jours plus tard.

Le 20 janvier, nous avons injecté en même temps la sérosité aux cobayes suivants :

Cobaye 80 : 2 c. c. Éprouvé 3 jours après, il résiste, avec un abcès consécutif. Néanmoins le 28 février, la dose mortelle de toxine concentrée de 4,5 c. c. l'a tué en 4 jours.

Cobaye 83 : 4 c. c. 3 jours après nous l'éprouvons. Il a une forte tumeur aboutissant à un abcès que nous trouvons ouvert le 3 février. Le 9 février nous prélevons du sang dans la carotide, ce qui le fait mourir le 12, avec un charbon symptomatique typique. C'était évidemment la plaie du cou qui était le point de départ de l'œdème charbonneux.

Cobaye 79 : 2 c. c. Éprouvé 6 jours après il succombe en 24 heures.

1. Nous mentionnerons pour mémoire que nous avons réussi à vacciner des cobayes en leur injectant une très petite quantité de virus dans le tissu dur de l'extrémité d'une patte postérieure, à l'imitation du procédé de MM. Arloing, Cornevin et Thomas, qui consiste à inoculer les vaccins au bout de la queue.

Cobaye 84 : 4 c. c. Éprouvé le 28, il meurt rapidement (en 15 heures).

Cobaye 81 : 2 c. c. Cette dose est répétée le 25. Éprouvé le 27, il a une tumeur, mais résiste et est vacciné. Un mois plus tard, nous l'éprouvons : abcès avec fistule.

Le cobaye 83 nous fournit un exemple de ce fait que M. Metchnikoff a signalé dans son étude sur le hog-choléra, à savoir que, chez un animal immunisé, on peut trouver des microbes virulents dans un abcès datant de dix-sept jours.

« Cette longue résistance des bactéries englobées, dit M. Metchnikoff, fait comprendre que, dans quelques circonstances défavorables pour l'organisme du lapin, le microbe parvienne à se développer et à tuer son hôte. » Dans notre cas la circonstance défavorable, c'est la saignée que nous avons fait subir au cobaye.

Dans la même étude, M. Metchnikoff a constaté que les animaux, vaccinés contre le hog-choléra, sont au moins aussi sensibles à la toxine élaborée par ce microbe que les animaux non vaccinés ; ils succombent même quelquefois à des doses qui ne tuent pas les animaux neufs. La mort du cobaye 80 confirme qu'il en est de même pour le charbon symptomatique.

Nous devons maintenant revenir à l'effet vaccinant du suc musculaire d'un cobaye mort de charbon symptomatique. C'est avec intention que nous avons surtout étudié l'effet d'une dose unique. C'est un procédé plus incertain que celui des doses répétées de M. Roux. Et l'effet en est d'autant plus passager que la dose est plus petite. Mais enfin, nous avons eu des résultats positifs, aussi bien avec de grandes qu'avec de petites doses, tandis qu'avec la toxine obtenue par nos cultures sur viande, nous n'avons pas pu obtenir de vaccination, quelle que soit la façon dont nous l'ayons administrée. Comment expliquer cette contradiction? De la manière suivante, à notre avis.

Il a été bien établi, par différents observateurs, que les animaux qui succombent à certaines maladies, au choléra inoculé dans le péritoine, par exemple, n'en donnent pas moins un sérum préventif. Nous avons constaté, nous-même, que des lapins (n°s 15 et 23), en train de mourir du charbon symptomatique, ont donné un sérum préventif contre cette maladie. Enfin, on sait bien que les cultures du pneumocoque (Talamon-Fränel) dans du sérum préventif contre la maladie, sont inoffensives

pour le lapin à des doses absolument mortelles sur d'autres milieux. On a même voulu en conclure que les microbes étaient atténués par le sérum; mais c'est à tort. Comme M. Issaeff l'a démontré, il suffit de séparer les microbes du sérum et de les injecter séparément pour prouver qu'ils sont des plus virulents, et que ces cultures ne sont inoffensives que parce qu'on injecte, avec les microbes, le sérum préventif dans lequel ils ont poussé.

Eh bien, il nous paraît qu'on fait précisément quelque chose de semblable en injectant le produit de filtration du suc musculaire d'un animal mort de charbon symptomatique. On injecte la substance préventive, déjà élaborée par l'organisme avant la mort, en même temps que la toxine préparée par le microbe. Et c'est par celle-là qu'on immunise, non pas par celle-ci.

Nous nous hâtons d'ajouter que nous ne croyons nullement impossible de transformer notre toxine en une substance vaccinante, soit par la chaleur, soit par le mélange avec un corps chimique, soit enfin en séparant ce que nous appelons toxine en une partie toxique et une partie vaccinante. Ce sont là des points que nous devons encore étudier. Mais, jusqu'à réfutation par l'expérience, nous croyons que la toxine non altérée se prête aussi difficilement à la vaccination que les toxines diphthérique et tétanique non altérées.

Certains auteurs croient, nous ne l'ignorons pas, que la substance préventive (ou antitoxique si on préfère ce mot) dérive de la toxine microbienne modifiée par les cellules du corps animal. Nous ne discuterons pas le bien-fondé de cette hypothèse. Il nous suffit de constater qu'elle ne contredit pas notre interprétation.

De ce qui précède, nous tirerons les conclusions suivantes :

1^o La toxine du charbon symptomatique, retirée des cultures sur viandes et non altérée, ne vaccine pas contre le virus vivant. Les cobayes qui la reçoivent paraissent au contraire plus sensibles à l'action de ce virus;

2^o Les cobayes qui ont reçu de la toxine sont pendant long-temps moins résistants à l'action de cette toxine que les cobayes neufs;

3^o La sérosité filtrée des animaux qui ont succombé au charbon symptomatique est vaccinante, non parce qu'elle contient de la toxine, mais parce qu'elle renferme la substance

préventive qui existe dans les humeurs des animaux immunisés;

4^o Le *bacterium Chauvai* peut persister longtemps, vivant et virulent, dans le corps des animaux vaccinés;

5^o Des lapins qui succombent à l'inoculation de ce microbe peuvent fournir un sérum préventif;

6^o Des animaux immunisés contre le virus vivant peuvent donner un sérum qui manifeste des propriétés antitoxiques *in vitro* et dans le corps d'un autre animal.

VIII

RELATIONS ENTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE ET LA SEPTICÉMIE AIGUE

La substance qui nous a servi de source de virus dans nos expériences sur le charbon symptomatique était la poudre vaccinante de M. Arloing. Nos expériences nous ont montré que, d'ordinaire, elle ne donne pas de tumeur charbonneuse au lapin. Il est donc bien légitime de la regarder comme du véritable charbon symptomatique.

Notre vibriqn septique est le virus qui, depuis des années, sert aux expériences de démonstration faites à l'Institut Pasteur pour le cours de bactériologie. Après deux passages par le cobaye, ce virus nous a servi à inoculer deux lapins très forts. Tous les deux en sont morts avec un œdème gazeux typique. Nous ajoutons qu'en dehors de cette différence d'action sur les animaux, il est très difficile de distinguer les deux microbes, soit au microscope, soit dans les cultures, soit par la marche de la maladie chez le cobaye. Il nous a paru seulement que, chez cet animal, notre charbon symptomatique évoluait encore plus vite que l'œdème malin : cela peut tenir au grand nombre de passages sur des animaux que le virus avait subi dans le courant de notre travail.

Pour savoir si les animaux immunisés contre le charbon symptomatique le sont aussi contre l'œdème malin, nous avions réservé un certain nombre d'animaux vaccinés au cours des expériences rapportées plus haut. Avant toute chose, nous les avons encore soumis à une inoculation d'épreuve avec une dose mortelle de *bacterium Chauvai*. Quatre cobayes, qui l'ont bien supportée, sont inoculés dans les huit ou quinze jours qui suivent avec du vibrio septique qui tue les témoins en quinze heures;

tous résistent. De même deux lapins, n° 31 et n° 10, qui ont eu plusieurs abcès charbonneux et qui sont rétablis, reçoivent l'un une 1/2 goutte, et l'autre une goutte entière de virus septique; ils restent bien portants¹, tandis que le lapin témoin est tué par une demi-goutte du même virus.

Il est donc hors de doute que des cobayes et des lapins immunisés contre le charbon symptomatique le sont aussi contre l'œdème malin. Si M. Kitasato n'a pas pu vérifier ce fait, déjà annoncé par M. Roux, c'est peut-être qu'il s'est servi d'une espèce de vibron autre que celle de l'Institut Pasteur, employée par nous.

Non-seulement le *bacterium Chauvæi* immunise contre le vibron de l'œdème malin, mais le sérum des animaux réfractaires au charbon symptomatique mélangé au virus septique empêche son effet :

Expérience. — Le 19 février, le cobaye n° 131, poids 580 grammes, reçoit le mélange de 1 c. c. du sérum du lapin n° 16 (vacciné contre le charbon symptomatique) avec 0,1 c. c. d'une dilution de sang septique au 1/20. Il reste tout à fait bien portant. Nous répétons l'expérience avec un témoin pour avoir toute sûreté.

Le 22 février, le cobaye 138 (de 500 grammes) reçoit 0,1 c. c. d'une solution au 1/20 de sang septique. Il meurt en 18 heures.

Le cobaye n° 159 (de 550 grammes) reçoit la même dose du virus avec 1 c. c. de sérum du lapin 16. Il a un petit gonflement de la cuisse qui disparaît après quelques jours.

Nos expériences avaient démontré que 1 c. c. de sérum du lapin 16 peut contrebalancer les effets d'une goutte entière de sang charbonneux. Nous avons alors essayé la même dose de sang septique.

Expérience. — Le 21 février, le cobaye 14 (de 770 grammes) reçoit dans la cuisse le mélange de 1 c. c. de sérum avec 1 goutte de sang charbonneux. Il a un peu de tuméfaction.

En même temps le cobaye 10 (de 660 grammes) reçoit la même dose du sérum avec 1 goutte de sang septique. Il meurt le lendemain (18 heures après).

Ces expériences attestent, nous semble-t-il, la parenté étroite de ces deux microbes anaérobies. Les différences entre eux viennent de ce qu'ils sont habitués à vivre et se sont spécialisés

1. En corrigéant les épreuves, j'apprends que ce lapin est mort cachectique un mois plus tard.

pour ainsi dire sur des espèces animales différentes. C'est pour cela, sans doute, que l'action de notre sérum est moins forte vis-à-vis du vibrion septique que du *bacterium Chauvæi*.

IX

ACTION DU BACILLE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE ASSOCIÉ A D'AUTRES BACTÉRIES

M. Roger a déjà constaté que le lapin, qui est naturellement résistant au charbon symptomatique, prend facilement cette maladie, lorsqu'on l'inocule avec du *bacterium Chauvæi* associé au *microbacillus prodigiosus*. Par contre, on sait qu'on peut empêcher le développement du charbon chez un lapin si on lui injecte, en même temps que la bactéridie charbonneuse, du bacille de Friedlaender. Les microbes ainsi ajoutés au virus soit pour renforcer leur action, soit pour la suspendre, agissent-ils d'une manière spécifique? Nous ne le pensons pas, et notre opinion est appuyée sur les expériences suivantes :

Expérience. — A une dose mortelle ordinaire (0,1 c. c. de sang dilué au 1/20) du virus du charbon symptomatique qui tue les cobayes en dix-huit heures au plus tard, on ajoute du bacille de Friedlaender, ce que l'on enlève sur une culture sur gélose au moyen d'une petite spatule de platine. Le mélange injecté dans la cuisse du cobaye 118 ne le tue qu'en 50 heures. On trouve les deux microbes dans le sang et le péritoine.

De même, un mélange de charbon symptomatique et de bacille pyocyanique fait périr le cobaye 86, seulement au bout de trois jours.

Enfin un mélange de charbon symptomatique et de *microbacillus prodigiosus*, fait dans les mêmes conditions, tue le cobaye 119 en quatre jours.

C'étaient alors surtout les effets du charbon symptomatique associé au *microbacillus prodigiosus* que nous avons étudiés. L'expérience que nous venons de rapporter a été faite sur un second cobaye, en ajoutant une plus grande quantité de *m. prodigiosus*: l'animal en est mort en 3 jours. De sorte que le même microbe qui facilite le développement du charbon symptomatique chez le lapin, espèce réfractaire, le retarde considérablement chez le cobaye, espèce beaucoup plus sensible à la maladie. Cet effet préservateur du *prodigiosus* est dû à l'appel des phagocytes au point d'inoculation et à une stimulation de ces cellules migra-

trices. Pour exalter leur action, nous avons essayé d'injecter aux cobayes des doses répétées de cultures de *prodigiosus* stérilisées par la chaleur. Nous avons constaté que cette bactérie, que l'on regarde d'ordinaire comme un saprophyte innocent, tue fort bien les cobayes à la dose de 1/8, à 1/6 d'une culture sur gélose âgée de 4 jours, lorsque l'injection est faite dans le péritoine.

On peut aussi accoutumer les animaux à l'action du *prodigiosus*, par l'introduction préalable d'une petite quantité du microbe vivant sous la peau, avant d'injecter le mélange du *prodigiosus* et du charbon symptomatique.

Expérience. — Le cobaye 403 est inoculé sous la peau avec une petite quantité de *prodigiosus* vivant. La petite tumeur qui en résulte est résorbée en trois semaines. C'est alors que nous l'éprouvons avec une spatule de *prodigiosus* mélangée à 0,1 c. c. d'une solution au 1/20 de charbon symptomatique. Il a un très fort gonflement dans la cuisse, puis un abcès qui s'ouvre huit jours après. Mais l'animal a résisté.

Les quatre cobayes n° 9, 153, 168 et 169 reçoivent chacun quatre fois la dose de 1/20, 1/30 d'une culture de *prodigiosus* sur gélose chauffée à 60°, et cela à des intervalles de 2-3 jours; un contrôle journalier des poids nous aide à ménager les animaux. Deux jours après la dernière dose, le cobaye 169 reçoit le mélange des 2 microbes (1 spatule de *prodigiosus*, plus 0,1 c. c. de charbon au 1/20). Il meurt en 3 jours, avec le mélange des 2 microbes dans le péritoine. Supposant que la dose du *prodigiosus* avait été trop forte, nous n'en mettons qu'une trace dans le mélange qui sert à éprouver le cobaye 168. Il a eu un abcès avec formation d'une fistule, mais il a résisté définitivement.

Ces deux expériences nous ont donc appris l'importance de la quantité de *prodigiosus* ajoutée : il faut en mettre assez pour exciter l'action phagocytaire, mais pas trop, sans quoi on produirait une intoxication de l'animal. Les deux cobayes, n° 153 et n° 9, traités avec le *prodigiosus* chauffé : avec les témoins n° 180 et n° 181, ont été éprouvés dans les conditions suivantes.

Expérience. — Le cobaye n° 9 (de 500 gr.) traité avec le *prodigiosus*, reçoit une trace de *prodigiosus*, à peu près 1/3 de ce qu'on peut recueillir avec la spatule, avec 0,1 c. c. d'une solution au 1/20 de charbon symptomatique. Il a un abcès avec fistule.

Le cobaye n° 181 (de 700 gr.), qui n'était pas traité au préalable avec le *prodigiosus* chauffé, reçoit exactement la même chose que le 9. Il meurt trois jours après.

Le cobaye n° 153 (de 530 gr.), qui a reçu du *prodigiosus* chauffé, est

éprouvé avec la même dose de charbon symptomatique, mais sans *prodigiosus*. Il meurt en 18 heures.

Le cobaye n° 180 (de 320 gr.), qui sert de témoin, reçoit la même dose de charbon symptomatique pur. Il meurt en 16 heures.

Nous avons donc suspendu nettement le développement du charbon symptomatique par le mélange du virus avec le *prodigiosus*. Si l'association avec un même microbe peut favoriser le développement du charbon symptomatique chez le lapin, espèce naturellement réfractaire, et par contre, en empêcher le développement chez le cobaye, espèce extrêmement sensible à la maladie, il nous paraît évident que l'action de ce microbe associé ne peut avoir rien de spécifique. Les deux phénomènes s'expliquent d'une façon naturelle par l'action du microbe sur les phagocytes. Dans le premier cas, il les paralyse; dans le second, il les excite.

Ces faits ont encore un autre intérêt. Pour étudier une maladie, on cherche toujours à expérimenter avec un virus pur. Mais il ne faut pas oublier que c'est une exception dans la nature qu'une infection simple ou pure, et que les infections mixtes y sont la règle. Nous osons même dire que cela est souvent heureux pour nous. Cet exemple de l'association d'un microbe pathogène avec un microbe banal, dont nous venons d'étudier l'effet, nous paraît se rapprocher beaucoup plus des conditions naturelles que l'infection par le microbe pathogène isolé. Ce sont surtout les microbes qui sont les hôtes ordinaires de l'homme et des animaux, et qui se trouvent sur les téguments ou dans les organes en communication avec l'extérieur, qui sont intéressants à étudier au point de vue des associations avec les virus.

C'est par cette idée que nous terminerons l'exposé de ces recherches, faites sous la direction de notre maître, M. le Dr Roux. Nous sommes heureux de profiter de cette occasion pour le remercier encore une fois de ses conseils journaliers, de sa critique continue, qui nous ont guidé dans notre travail et qui, seuls, l'ont rendu possible. Merci de même à notre cher ami M. le Dr C. Nicolle, professeur suppléant à Rouen, qui a bien voulu nous aider dans la rédaction de ce mémoire.

ÉTUDES SUR LA RAGE

PAR MM. BABES ET AL. TALASESCU

(Travail de l'Institut de pathologie et de bactériologie de Bucarest).

I

EXPÉRIENCES FAITES POUR MONTRER LA VALEUR DE LA CAUTÉRISATION DE LA PLAIE, PRODUITE PAR LA MORSURE D'UN ANIMAL ENRAGÉ

L'importance de la cautérisation, après la morsure d'un animal enragé, a été toujours reconnue : la statistique de M. Proust montre 76 morts parmi 117 mordus non cautérisés, et 89 décès sur 249 personnes cautérisées. La même conclusion ressort aussi de la statistique de l'Institut Pasteur et de celle de notre Institut.

Il était cependant nécessaire de demander à l'expérimentation une notion plus précise sur l'efficacité de la cautérisation.

De nos expériences (*Connaissances médicales*, 1887) sur l'action des différents agents antiseptiques, il résulte que le virus rabique est très sensible, surtout à l'action de la chaleur. Une température de 40° C. tue le virus en quelques heures; une température de 58° l'atténue déjà après 5 minutes. A 60°, le virus est détruit en 30 minutes environ; à 65°, en quelques minutes; à 70°, presque immédiatement. Le mélange de moelle filtrée sur papier Joseph avec 1 : 1,000 sublimé ou 1 : 100 acide phénique conserve sa virulence pendant plusieurs heures. Il la conserve encore de 15 à 30 minutes, avec 5 0/0 d'acide phénique; il s'atténue au contraire en 15 minutes, au contact de la solution de Gram. Les acides minéraux forts tuent le virus presque immédiatement.

Ces substances pourraient servir à détruire le virus rabique dans une plaie, si on pouvait l'atteindre avant sa résorption, qui se fait très vite; ainsi, en inoculant le virus dans un nerf, même

si on coupe le nerf après quelques minutes dans une étendue d'un centimètre, l'infection se produira.

Voici une série d'expériences pour montrer l'effet des cautérisations pratiquées chez le chien : après avoir produit des lésions analogues aux plus graves morsures à la face, telles que section de la paupière, plaies profondes jusqu'à l'os dans la région supra-orbitaire avec section du nerf supra-orbitaire, plaie profonde avec section du nerf facial près de sa sortie, on a imprégné toutes ces plaies avec la moelle de lapins morts de rage fixe.

Après des temps différents, 8 de ces chiens ont été profondément cautérisés avec le thermocautérite de Paquelin.

CAUTÉRISÉS APRÈS L'INFECTION			RÉSULTAT
N°	1.	Après 7 minutes.	Vit encore après 8 mois.
—	2.	— 10 —	Mort de rage après 50 jours.
—	3.	— 25 —	Vit encore après 8 mois.
—	4.	— 60 —	Mort de rage après 20 jours.
—	5.	— 2 heures.	— — — 25 —
—	6.	— 5 —	— — — 19 —
—	7.	— 24 —	Vit encore après 8 mois.
—	8.	— 24 —	Mort après 24 jours.
—	9. Non cautérisé (contrôle).	—	— 18 —
—	10.	—	— 21 —

La même expérience faite avec des lapins donne le résultat suivant :

CAUTÉRISÉS APRÈS L'INFECTION			RÉSULTAT
N°	1.	Après 5 minutes.	Survit.
—	2.	— 5 —	Mort après 34 jours enragé.
—	3.	— 10 —	Survit.
—	4.	— 10 —	Mort de rage après 20 jours.
—	5.	— 20 —	Survit.
—	6.	— 20 —	—
—	7.	— 25 —	Mort après 19 jours, de rage.
—	8.	— 30 —	— 13 —
—	9.	— 30 —	— 14 —
—	10.	— 40 —	— 17 —
—	11.	— 40 —	— 14 —
—	12.	— 60 —	— 18 —
—	13.	— 60 —	— 14 —
—	14. Non cautérisé.	—	— 14 —
—	15.	—	— 16 —

Le même effet est produit par la cautérisation profonde avec des acides forts. En badigeonnant la plaie infectée avec de la teinture d'iode, et en faisant des injections d'un gramme de la même substance autour de la plaie, 10 minutes après l'injection, on a arrêté deux fois l'éclosion de la maladie chez le chien.

Il résulte de ces recherches que, même après 5 minutes, la cautérisation des plaies profondes et graves ne garantit pas d'une manière certaine contre l'évolution de la maladie; toutefois ce moyen n'est pas négligeable; car si on emploie la cautérisation dans les 30 premières minutes après la morsure, on sauve la moitié des animaux qui, sans ce procédé, mourraient sûrement de la rage. On voit qu'exceptionnellement on peut même sauver des chiens en appliquant ce procédé 24 heures après l'infection.

Mais il résulte de ces essais encore un autre fait important, c'est que, par la cautérisation, on peut retarder l'éclosion de la rage, ce qui, justement dans les cas graves, est de la plus haute importance; car, en gagnant du temps, la vaccination antirabique peut devenir efficace dans des cas où la maladie, par sa gravité même, aurait eu tendance à se déclarer trop tôt. On voit en effet que même si la maladie éclate après cautérisation pratiquée dans les premières 30 minutes depuis l'infection, elle est retardée de plusieurs jours et même des semaines. Enfin, on peut recommander l'injection de teinture d'iode autour de la plaie, comme un bon moyen d'arrêter ou d'atténuer l'infection.

II

ATTÉNUATION DU VIRUS RABIQUE PAR LE SUC GASTRIQUE; VACCINATION
PAR LA VOIE DIGESTIVE

Beaucoup de savants, M. Pasteur lui-même, puis l'un de nous, Hœgyes et d'autres ont essayé de trouver des moyens d'atténuation qui puissent avantageusement remplacer la dessiccation des moelles rabiques. Cette dessiccation, quoique parfaitement efficace et régulière entre les mains de M. Pasteur et de ses élèves, offre, dans les Instituts moins bien installés, des difficultés pratiques, de nature à compromettre le résultat du traitement. Il serait sans doute préférable de pouvoir, avec la moelle et le cerveau d'un lapin rabique, faire une préparation stable et possible à

conserver. Mais les tentatives dans ce sens ont eu des résultats incertains et contestés en partie, de sorte qu'on est ordinairement revenu au procédé de Pasteur.

Dans ce dernier temps, l'un de nous avait ajouté au traitement très intensif un traitement avec l'hémato et sérothérapie antirabique (Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891). Tizzoni et Centanni ont publié¹ depuis des résultats étonnantes sur le traitement antirabique au moyen de virus atténué par le suc gastrique artificiel. La destruction du virus rabique dans le tube digestif est depuis longtemps connue, mais on expliquait en partie l'inoffensivité du virus par cette voie, par la barrière épithéliale des muqueuses. C'est surtout Wyrsikowski² qui a démontré que le suc gastrique détruit rapidement le virus rabique.

Tizzoni et Centanni ont opéré avec le suc gastrique artificiel, et ont obtenu, par une digestion de 19 heures *in vitro*, une substance tout à fait inoffensive et vaccinale.

D'après nos recherches, l'action du suc gastrique naturel (obtenu par la fistule stomachale d'un chien normal), sur le virus rabique, est plus puissante que celle du sang immunisant ou de l'extrait de thymus. Pour un gramme de moelle virulente dans 10 grammes de suc gastrique à 20° (c'est la température à laquelle restent nos moelles pour le traitement antirabique), 4 heures 1/2 suffisent pour ôter à l'émulsion sa virulence. Ainsi un chien trépané et injecté sous la dure-mère avec du virus laissé 5 heures en contact avec le suc gastrique, reste sain. Sur trois chiens inoculés avec le virus atténué pendant 4 heures 1/2, deux restent sains et un meurt de rage. Sur trois chiens inoculés avec le virus qui a été en contact pendant 3 heures, deux gagnèrent la rage sans retard appréciable.

Du moment que le suc gastrique est capable de transformer le virus rabique en vaccin, il était intéressant d'essayer si l'ingestion de la substance nerveuse ne possède pas un pouvoir vaccinal. M. Nocard, s'appuyant sur quelques expériences, a affirmé que non. Nous avons choisi un chien de taille moyenne, qui a été nourri, du 15 au 30 septembre 1892, chaque jour avec deux cerveaux frais de lapins morts de rage fixe. Le 12 novembre,

1. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1892.

2. WYRSIKOWSKY, Wratsch, 1891, n° 38.

il est infecté sous la dure-mère avec le virus d'un loup enragé. En même temps, on en inocule un chien de contrôle. Le premier chien reçoit encore du 12 au 20 novembre, chaque jour, deux cerveaux de lapins morts de rage fixe. Le chien de contrôle gagne la rage le 25 novembre, tandis que le chien n° 1 est jusqu'à présent d'une parfaite santé.

Nous n'avons que cette expérience à citer, mais la question mérite, nous croyons, d'être l'objet d'une étude plus approfondie. Si M. Nocard a échoué dans cette voie, c'est peut-être qu'il n'a pas maintenu assez longtemps l'alimentation rabique de ses animaux d'expérience.

NOUVEAUX ESSAIS DE VACCINATION ET DE TRAITEMENT ANTIRABIQUE
PAR LE SÉRUM D'ANIMAUX FORTEMENT VACCINÉS

Déjà, au commencement de l'année 1890, nous avons publié dans ces *Annales*, en collaboration avec M. Lepp, des résultats concluants sur la vaccination des chiens, même après morsure, avec le sang d'animaux très vaccinés. *C'étaient les premiers résultats positifs de vaccination contre une maladie naturelle, avec le sang des animaux immunisés.* Nous avons repris ces recherches, en collaboration avec M. Cerchez (ces *Annales* 1891, etc.) avec le même résultat, et nous avons introduit, en 1890, ce principe de vaccination dans le traitement antirabique chez l'homme. (*Annales de l'Institut de pathologie et de bactériologie*, 1891, Bucarest, vol. II.)

Comme nous possédons maintenant beaucoup de chiens très vaccinés, nous répétons et élargissons à l'aide de ces animaux, de temps en temps, nos recherches.

Tout d'abord, nous avons cherché lequel des éléments du sang préserve et guérit. Nos chiens immunisés et qui ont été infectés quatre et cinq fois, sous la dure-mère, avec le virus fixe, après avoir reçu plusieurs traitements forts et, de temps en temps, des quantités considérables (10 à 20 grammes) de virus fixe sous la peau, nous ont donné le sang que nous avons en partie inoculé à un chien tel qu'il était extrait. D'autres animaux recevaient le sérum et d'autres les caillots formés. Enfin, on a inoculé chez un autre chien le sang désébriné dont le caillot était incomplètement formé et dont le sérum était encore assez coloré.

a) Deux chiens ont reçu deux jours de suite, 5 c. c. de sérum pur; le lendemain ils ont été infectés par le virus fixe injecté dans le corps vitreux de l'œil, après avoir insensibilisé la conjonctive à l'aide de la cocaïne. Le même jour et les trois jours suivants ils reçoivent 10 c. c. de sérum pur, le quatrième jour 20 c. c.; après un intervalle de 6 jours, de nouveau deux jours de suite 10 et 15 c. c. de sérum. Les chiens sont encore vivants après un an et sept mois.

b) Un autre chien reçoit le même traitement, mais avec le sérum incomplètement décoloré et défibriné. Il succombe de la rage 19 jours après le commencement du traitement.

c) Deux autres chiens reçoivent la même quantité d'inoculation faite avec le caillot, passé à l'étamine, du sang des mêmes chiens. Ces deux animaux et un chien de contrôle meurent à peu près en même temps de la rage, 16-17 jours après l'infection.

Il résulte donc de ces expériences que c'est le sérum du sang qui est le plus efficace pour vacciner et pour guérir la rage, tandis que le sérum sanguinolent et le caillot ne peuvent pas empêcher la rage après une infection très forte.

On sait que les lapins sont beaucoup plus difficiles à vacciner contre une forte infection que les chiens. L'un de nous avait obtenu, il y a longtemps, par la vaccination pasteurienne, deux lapins réfractaires contre l'infection sousdurale avec le virus fixe, tandis que, dans d'autres essais très nombreux, nous avons toujours échoué. Dans nos recherches publiées dans ces *Annales*, on trouve des résultats partiels, c'est-à-dire une prolongation remarquable de la durée d'incubation, produite par une vaccination antérieure avec du sang des chiens immunisés. En répétant ces expériences, voici nos résultats :

a) Un lapin de 4,000 grammes reçoit les 9, 11 et 14 juillet 1892, 1,5 c. c. de sérum pur sous la peau; le 16 juillet il est inoculé dans le corps vitreux avec le virus fixe. Le 28, il est paralysé. Le 29, il reçoit 3 c. c. de sérum dans la veine jugulaire. Après une heure, il se lève et paraît être bien portant; on répète l'opération après deux heures; après cinq heures, il reçoit encore 3 c. c. de sérum pur dans le péritoine. 14 heures après la première injection thérapeutique, la paralysie recommence, et malgré une nouvelle injection péritoneale, l'animal succombe le lendemain.

b) Un autre lapin traité à la même époque, de la même manière, tombe malade avec un commencement de paralysie. Le 30 juillet, il est inoculé avec 3 c. c. de sang dans la veine jugulaire. Après deux heures, il se lève, commence à manger et reste bien portant pendant deux jours. Pendant ce temps, il reçoit quatre fois du sérum dans les veines et dans le péritoine. Le 2 août, la paralysie recommence, une nouvelle injection intra-

veineuse n'a qu'un effet passager et incomplet. La mort survient le 3 août.

c) Un troisième lapin de 900 grammes reçoit le même traitement. Il gagne la maladie seulement le 3 août et meurt après une amélioration de quelques heures, après une inoculation intraveineuse le 5 août, c'est-à-dire onze ou douze jours après la mort des deux lapins de contrôle, qui, après avoir été infectés le même jour et de la même manière, succombent le 23 et le 26 juillet à la rage fixe.

Cette série d'expériences montre déjà :

1^o Que trois injections sous-cutanées de sérum, faites avant une infection intrabulbaire très forte, produisent un retard sensible dans la manifestation de la rage chez le lapin;

2^o Que, chez ces animaux, l'injection intraveineuse et intra-péritonéale du sérum, pratiquée après le commencement de la paralysie, produit une amélioration évidente, quoique passagère. Cette amélioration semble se produire seulement dans la rage atténuee ou retardée, car une autre série de lapins, inoculés sous la dure-mère avec le virus fixe, et traités de la même manière après l'apparition des premiers symptômes, n'éprouvaient aucune amélioration de leur état, après plusieurs injections intra-veineuses et péritonéales du même sérum.

Pour avoir une plus grande quantité de sérum immunisant, nous avons immunisé, par la méthode de Pasteur et de Galtier, deux moutons dont on a renforcé le pouvoir immunisateur du sang par des trépanations répétées et par l'inoculation sous-cutanée de grandes quantités de virus fixe, pendant un an. Le sang de ces moutons a été recueilli périodiquement, et le sérum précipité par l'alcool, séché dans le vide, et conservé sous forme de poudre. (Voyez nos expériences publiées au *Congrès d'hygiène de Londres, 1891.*)

a) 3 lapins ont été infectés sous la dure-mère avec le virus fixe et un autre dans le corps vitreux. Au début de la fièvre prodromique, ces animaux reçoivent chaque jour 0^{gr},25 du précipité dilué dans 10 grammes de bouillon. Mais ce procédé ne modifia en rien la marche de la maladie, et tous les lapins moururent le dixième jour.

b) En modifiant le traitement, on obtient au contraire des résultats remarquables. Ainsi, nous inoculons deux lapins de 1,400 grammes et de 1,000 grammes, les 9 et 17 octobre 1892, chaque jour avec 0^{gr},25 de précipité. Le 23/X, ces lapins et un lapin de contrôle sont infectés dans le corps vitreux avec le virus fixe. Le lapin de contrôle meurt le 29/X de la rage fixe. Les deux lapins traités reçoivent le 24-29/X, de nouveau, du précipité. Le plus petit des lapins meurt de la rage le 4/XI, 3 jours après le

lapin de contrôle; l'autre lapin reste bien portant. Le 18/XI, il faiblit sans présenter des symptômes de la rage. On lui donne le 19/XI, 8 grammes et 4 grammes du sang de chien immunisé, et la même dose le jour suivant. Il vit encore un mois après, et meurt d'une maladie accidentelle, car sa moelle n'est pas virulente.

c) Le précipité alcoolique du sérum des chiens possède le même pouvoir vaccinatoire. Trois lapins de 1,000 à 1,200 grammes reçoivent, du 19/XI jusqu'au 1/XII 1892, chaque jour 0gr^r,30 de précipité du sérum de chien fortement vacciné. Le 5/XII, ils sont infectés dans le corps vitreux avec le virus fixe, en même temps qu'un lapin de contrôle qui succombe neuf jours après de la rage fixe. Les lapins vaccinés reçoivent les 7, 9 et 11/XII, encore 0gr^r,30 du précipité. *Ils survivent tous.* Parmi les lapins vaccinés, l'un meurt le 24/XII avec cachexie, sans symptômes de la rage; l'autre succombe le 24/XII sans lésions de la rage, et le troisième meurt d'une pleuropneumonie le 30/XII. Un quatrième lapin, qui a été seulement vacciné avec les autres sans être infecté, meurt de cachexie le 20/XII. Les moelles de ces lapins n'étaient pas virulentes.

Cette série d'expériences montre donc qu'on peut vacciner les lapins, même contre le virus le plus fort, par des injections des précipités alcooliques du sérum de sang des chiens fortement immunisés. Le même résultat a été obtenu avec le précipité du sérum d'un mouton récemment immunisé, de sorte que cette dernière expérience semble montrer que, pour la vaccination de la rage, on n'a pas besoin du sang des moutons immunisés depuis longtemps.

Il est regrettable que les lapins, vaccinés avec le sang ou le précipité de sang des moutons ou des chiens, succombent à la fin à une cachexie générale, de sorte qu'on ne peut pas continuer les expériences au delà de deux mois. Cette cachexie tient, probablement, en partie, à ce que le sang qu'on leur a inoculé est un peu toxique pour eux. Cette toxicité du sang d'une espèce pour une autre espèce a été constatée par Rummo. L'un de nous (Babes) avait observé, il y a longtemps, que pour vacciner avec du sang, il est préférable de se servir du sang de la même espèce. Ainsi, avec du sérum de chiens, on peut vacciner avec plus de sûreté un chien que d'autres animaux. Cependant, comme l'action du virus fixe, inoculé sous la dure-mère ou dans le corps vitreux, est absolument sûre et régulière, on peut pour le moment faire abstraction, dans les expériences mentionnées, de cette mort tardive par cachexie; il suffit de constater la propriété que possède le sérum d'empêcher la manifestation de la rage.

On verra la même chose dans les expériences suivantes, faites avec du sérum liquide, où le traitement avait commencé après l'infection intrabulbaire *avec du virus du loup.*

a) 5 lapins de 1,000-1,200 grammes ont été inoculés le 14/VIII/1892, avec la moelle d'un loup enragé. Les deux lapins de contrôle succombent après 12 et 14 jours, à la rage paralytique. Un autre reçoit après 7 jours, le 21/VIII et les deux jours suivants, 0^egr 35 du précipité de sérum de chien, et ensuite chaque jour, jusqu'au 2/IX, 5 grammes de sérum liquide de mouton et de chien. Il succombe le 3/IX d'une manière brusque; sa moelle n'est pas virulente.

b) Une autre lapin reçoit, 7 jours après l'injection et les jours suivants, 3-45 grammes de sérum; ce traitement continue avec des intervalles jusqu'au 9/IX, jour où il est trépané avec le virus fixe. Il succombe le 18/IX, sans symptômes de rage, et sa moelle n'est pas virulente.

c) Un troisième lapin a été traité de la même manière, mais avec des doses plus faibles (4 c. c. à la fois); on l'infecte le 9/IX sous la dure-mère avec le virus fixe, et il vit encore le 6/XII, jour où on se sert de son sang pour vacciner d'autres lapins. Il faut remarquer que ce lapin ne recevait pas de doses aussi grandes de sérum que le précédent, qui avait reçu jusqu'à 15 c. c. par jour.

Les mêmes expériences ont été faites avec le virus fixe.

a) On commence d'injecter, le 26/X/1892, à trois lapins de 1,200-1,400 grammes, 5 c. c. de sérum de chien immunisé, pendant 35 jours, presque chaque jour. Le 5/XII, ils sont inoculés dans le corps vitreux avec le virus fixe.

Après trois jours l'un d'eux succombe à une pleuropneumonie.

b) Le deuxième lapin, traité de la même manière, survit à l'infection intra-oculaire de virus fixe, après avoir reçu encore du 6 au 12/XII 4 grammes, et du 13 au 15, 10 grammes de sérum de chien par jour.

c) Le troisième lapin, traité de la même manière, gagne la rage 15 jours après l'infection intra-oculaire, tandis que le lapin de contrôle succombe le dixième jour après la même injection.

Tandis que dans 20 expériences nous ne réussissons pas à sauver les lapins infectés par la trépanation avec du virus fixe en leur injectant ensuite du sérum de sang de chien, nous avons eu deux succès sur trois expériences, en employant le *sérum des lapins rendus réfractaires contre l'action du virus fixe.*

Le 6/XII 1892, on infecte 6 lapins sous la dure-mère avec le virus fixe. Trois de ces lapins servant de contrôle succombent le 8^e jour, à la rage fixe.

Deux des trois autres sont traités de la manière suivante :

Ils reçoivent immédiatement après la trépanation :

Le	6/XII	4 grammes de sérum de lapin <i>dans le péritoine.</i>
—	7/XII	2
—	8	2
—	9	4
—	10	4
—	10	6 sous la peau.
—	11	de chien —
—	12	8
—	13	8
—	14	10
—	14	5 <i>dans le péritoine.</i>
—	14	5 sous la peau.
—	14	5 dans les muscles.

Ces deux lapins sont encore bien portants après trois mois. Le troisième lapin, traité presque de la même manière, succombe de la rage le 17/XII/92, c'est-à-dire avec un retard de 5 jours, ce qui est très remarquable, via le mode d'infection. Ce lapin avait reçu, les 7, 8, 9/XII, la même quantité de sang de lapin que les lapins qui ont survécu, *mais sous la peau*, tandis que les lapins qui ont survécu ont reçu ce sérum dans le péritoine. Une autre cause du succès moins complet chez cet animal a été peut-être que le lapin qui a donné le sang pour sa vaccination était moins vacciné que les lapins qui ont fourni le sang pour vacciner les deux autres.

L'IMMUNITÉ HÉRÉDITAIRE

On pourrait supposer, surtout après les publications de Bardach, de Högyes et de Tizzoni, qu'une forte immunisation serait capable de donner ordinairement une immunité héréditaire. En effet, ces auteurs décrivent des cas où, le père et la mère étant immunisés, les petits résistaient à l'infection antirabique. Une expérience faite en ce sens dans notre Institut montre que cette immunité héréditaire n'est pas la règle.

Comme nous disposons toujours d'un grand nombre de chiens très vaccinés, nous avons accouplé deux de ces chiens qui possèdent un sang très efficace comme vaccin, et qui avaient reçu des quantités énormes de virus fixe sous la peau et 5 fois sous la dure-mère.

Le 8 juillet 1892, la femelle met bas et allaita ses 4 petits.

Le 22 août, on infecte trois des petits avec le virus des rues dans le bulbe oculaire.

Le 7 septembre, les trois petits chiens montrent les symptômes de la rage et ils succombent les 19 et 20 septembre. A la

même date, les parents sont infectés sous la dure-mère, avec le virus fixe, mais ils restent bien portants.

VACCINATION DES CHIENS PAR LE VIRUS FIXE

Nous citerons un nouvel exemple à ajouter à ceux qu'on a déjà de vaccination des chiens par du virus fixe déposé dans le tissu cellulaire.

Nous avons injecté le 9 octobre 1892 et le 1^{er} septembre 1893, à une série de 6 chiens, dans le tissu sous-cutané des flancs, 1 c. c. d'une émulsion de virus fixe à 1/10.

Les trois jours suivants, ils reçoivent 1,5 c. c. de virus fixe et les trois jours suivants 2 c. c.

Une première série de 4 chiens reçoit, en même temps qu'un chien de contrôle, 32 jours après le commencement de ce traitement, une injection intracranienne avec le virus du loup enragé. Le même jour, on reprend la vaccination avec 5 grammes de virus fixe par jour, pendant huit jours. Les quatre chiens sont encore bien portants, tandis que le chien de contrôle meurt de la rage le 25 novembre, 13 jours après la trépanation.

Les deux chiens de la seconde série reçoivent du 4-14 octobre 1893, chaque jour, 5 à 10 grammes d'émulsion de virus fixe. Ils sont infectés le 20 octobre sous la dure-mère avec le virus fixe, sans gagner jusqu'à présent la rage. Depuis la première expérience, nous avons encore plusieurs fois vacciné des chiens avec du virus fixe sans en perdre un seul par la rage.

LETTRE de M. le Dr Em. PUSCARIU

Directeur de l'Institut antirabique de Jassy

A M. PASTEUR

Monsieur Pasteur, à Paris.

Nous avons l'honneur de vous adresser la statistique établie pour notre Institut, depuis sa création jusqu'au 1^{er} mai 1894. Si, jusqu'à présent, nous ne vous avons pas fait connaître l'existence de cet Institut, c'est que nous voulions, avant de vous en faire part, arriver à un résultat satisfaisant ; aujourd'hui, après avoir traité 360 cas, et la mortalité n'ayant été que de 0,27 0/0, nous croyons qu'il est de notre devoir de vous communiquer les résultats obtenus par votre traitement.

L'Institut antirabique de Jassy a été créé comme une institution qui s'imposait pour notre pays, au mois de juin 1891 ; il a commencé à fonctionner régulièrement le 6 août suivant, jour où il a reçu et traité le premier malade.

Les fondateurs en étaient : le regretté docteur *Eugène Rizou*, ancien doyen de la Faculté de médecine de Jassy, directeur du laboratoire de thérapeutique expérimentale près la chaire de pharmacologie, un des meilleurs élèves de l'école française de *Montpellier*, et le soussigné, professeur d'histologie de la même Faculté de Jassy, et ancien assistant de l'Institut de bactériologie de Bucharest.

L'Institut fonctionnait à cette époque comme service annexé au laboratoire de thérapeutique, recevant une subvention du ministère de l'Instruction publique.

Au mois de décembre 1882, après la mort prématurée du docteur Rizou, le service antirabique devint une institution indépendante de la Faculté, en passant sous le contrôle immédiat du Service supérieur sanitaire, grâce à la sollicitude de son savant directeur, le docteur *Félix*. Depuis lors, la direction de

l'Institut resta confiée au soussigné, assisté par le docteur *Lebell* et le docteur *Vesesco*.

Le procédé employé dans le traitement est le vôtre, auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

1^o La durée du traitement est plus longue (de 20 à 35 jours), ainsi qu'on le pratique à l'Institut de bactériologie de Bucharest ;

2^o Depuis une année et demie, les moelles, au lieu d'être triturées avec du bouillon, sont préparées dans une émulsion de virus fixe, laquelle est en proportion d'un cerveau de lapin pour 100 c. c. d'eau distillée, filtrée à la trompe, et stérilisée à 80° pendant 15 minutes.

Nous avons introduit cette modification en nous appuyant sur les expériences faites d'abord par moi, en collaboration de MM. *Babes* et *Lepp* (*Annales de l'Institut Pasteur* 1889), et répétées plus tard avec plus de succès dans notre Institut sur un grand nombre d'animaux. Dans ces expériences, nous étions guidés par l'idée exprimée par vous, dans votre lettre à M. *Duclaux* en 1886, qu'à côté de la substance virulente de la rage, il existait probablement une matière chimique vaccinante plus résistante que le virus rabique ; c'est ainsi qu'en tuant le virus vivant par une température qui ne détruit pas la matière vaccinante, nous avons cru obtenir cette dernière d'une manière analogue aux résultats obtenus par vous, en collaboration avec M. *Viala*, et communiqués à l'Académie des sciences.

Agréez, cher maître, l'assurance de notre plus haute admiration.

*Le Directeur de l'Institut antirabique de Jassy,
Prof. Dr ÉMILE PUSCARIU.*

Voici pour chaque année : — 1^o le nombre des personnes traitées ; — 2^o le nombre des morts pendant le traitement ou dans la quinzaine qui a suivi la dernière inoculation ; — 3^o le nombre des morts après cette période ; — 4^o le pourcentage de la mortalité.

Années	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
1891	34	0	0	0
1892	133	2	0	0
1893	144	1	1	0,7
1894	50	1	0	0
	<u>361</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0,27%</u>

STATISTIQUE DE L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE JASSY

DU 6 AOUT 1891 AU 1^{er} MAI 1894

	A	B	C
Morsures à la tête { simples	8	19	6 (19)
et à la figure { multiples	11	1	13
Cautérisations efficaces	2	1	3
— inefficaces	2	1	3
Pas de cautérisation	17	9	16
Morsures aux mains { simples	15	9	22
et multiples	51	5	31 (53)
Cautérisations efficaces	3	1	3
— inefficaces	9	1	14
Pas de cautérisation	32	12	36
Morsures aux membres et au tronc { simples	11	3	31
multiples	26	6	56 (87)
Cautérisations efficaces	2	3	4
— inefficaces	8	4	7
Pas de cautérisation	29	5	76
Habits déchirés	25	7	51
Morsures à nu	12	2	36
Morsures multiples en divers points du corps	16	10	12
Cautérisations efficaces	2	5	2
— inefficaces	2	2	2
Pas de cautérisation	16	3	12
Habits déchirés	15	7	5
Morsures à nu	4	3	12
<hr/>			
Totaux	438	84	171
<hr/>			
TOTAL GÉNÉRAL		343	

La colonne A se rapporte toujours aux cas dans lesquels la rage de l'animal mordeur était certaine; la colonne B à ceux où la rage était constatée par examen vétérinaire; la colonne C aux cas où la rage était seulement probable.

Il faudrait ajouter au tableau 18 cas dans lequel l'animal mordeur était simplement suspect de rage, en tout 361 cas.

Les animaux mordreurs ont été : loup, 26 fois; homme, 3 fois; cheval, 1 fois; chat, 6 fois; chien, 325 fois.

Le Gérant : G. MASSON.
